

**T D M**  
TRAVAUX ET DOCUMENTS  
MICROFICHES

N° 78

F2

# LA NODULATION CAULINAIRE DANS LE GENRE *AESCHYNOMENE*

Didier ALAZARD

**ORSTOM**  
Editions

**Université Claude Bernard - Lyon I**

**THESE DE DOCTORAT**

**(spécialité Ecologie Microbienne)**

présentée par

**Didier ALAZARD**

**ORSTOM**

**Laboratoire de Biologie des Sols  
Dakar (Sénégal)**

***La nodulation caulinare  
dans le genre Aeschynomene***

soutenue le 6 juin 1991  
devant la commission d'examen composée de:

**M. René BARDIN**

**Président**

**M. Bernard DREYFUS**

**M. Emile DUHOUX**

**Rapporteur**

**Mme Claudine ELMERICH**

**Rapporteur**

**Mme Monique GILLIS**

**M. Philippe NORMAND**

# TDM 78



**Editions de l'ORSTOM**

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

***Collection :***

**Travaux et Documents Microédités**

**PARIS 1992**

**ISBN : 2-7099-1076-4**

© ORSTOM

**F 2**

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2  
« et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions  
« strictement réservées à l'usage privé du copiste et non des-  
« tinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les  
« analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et  
« d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale,  
« ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses  
« ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article  
« 40). »

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé  
« que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par  
« les articles 425 et suivants du Code pénal.»

Ce mémoire a fait l'objet d'une thèse de doctorat présentée à  
l'Université Claude Bernard - Lyon I, le 6 juin 1991.



à la mémoire de mon père,  
à ma mère,  
à Annaïck,  
à Vincent, Ninon et Olivier,

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar (Sénégal), où j'ai trouvé un cadre et des moyens de travail très favorables. Je tiens, en premier lieu, à remercier respectueusement la direction de l'ORSTOM pour m'avoir permis de mener à bien mes recherches dans ce laboratoire.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance et mon amitié à M. Bernard Dreyfus, découvreur du *Sesbania rostrata* et initiateur des recherches sur les légumineuses à nodules caulinaires, qui m'a fait profiter de ses compétences et de son expérience en rhizobiologie.

Je remercie tout particulièrement M. le Pr Emile Duhoux pour m'avoir fait bénéficier de sa très grande compétence dans le domaine de la biologie végétale et de la cytologie, pour la fructueuse collaboration qui s'est établie entre nous et pour avoir accepté de se charger de la tâche de rapporteur.

Je suis infiniment reconnaissant à M. le Pr René Bardin, qui malgré la distance qui nous séparait a accepté de diriger ce travail, m'honorant ainsi de sa confiance. Il me fait, en outre, l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Il m'est agréable de remercier Mme le Pr Claudine Elmerich pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à mon travail et pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Une partie de ce travail s'est déroulée au laboratoire de microbiologie et de génétique microbienne (LMG) de l'université de Gand, dirigé par M. le Pr Karel Kersters. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour son accueil et la disponibilité dont il a toujours fait preuve à mon égard malgré ses lourdes tâches de recherche et d'enseignement. Je ne saurais dissocier de ces derniers remerciements, pour les mêmes raisons et pour sa participation à ce jury, Mme Monique Gillis.

J'adresse enfin ma vive reconnaissance à M. Philippe Normand pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Parmi les personnalités qui se sont intéressées à mes recherches, j'ai le plaisir de remercier M. le Pr Jean-Paul Aubert, MM. Yvon Dommergues, Jean Dénarié et Georges Truchet. Ils ont toujours manifesté, vis-à-vis de mon travail, un intérêt bienveillant.

Je remercie M. Tidjane Badji pour sa collaboration technique efficace et amicale.

Mes remerciements vont également à

- M. Mathias Becker, pour son aide dans la partie appliquée de ce travail,
- M. Gérard Rinaudo, qui m'a fait profiter de son expérience dans la mise en place des expérimentations au champ et de sa connaissance de la biologie de *Sesbania rostrata*,
- M. Jean-Marc Leblanc pour sa participation dans la présentation de ce mémoire,
- M. J. P. Lebrun, de l'EMVT de Maisons-Alfort, pour son aide dans l'identification des espèces d'*Aeschynomene* originaires du Sénégal.
- M. le Pr A. E. Kretschmer de l'université de Floride, pour m'avoir fourni quelques unes des espèces d'*Aeschynomènes* utilisées dans cette étude,
- M. Harold H. Keyser, USDA-ARS, Beltsville (USA), à M. M. J. Trinick, CSIRO de Canberra (Australie), et au conservateur de la collection de micro-organismes du Niftal Project and MIRCEN, université d'Hawaï, pour m'avoir aimablement fourni les souches de rhizobia de référence,
- M. le Pr Xavier Mattéi pour l'utilisation du microscope électronique du département de Biologie animale de l'université de Dakar ,
- M. Louis, attaché au service de microscopie électronique de l'institut d'embryologie cellulaire et moléculaire (Nogent sur Marne) dirigé par Mme le Pr Le Douarin.

Que tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé et soutenu aux titres les plus divers trouvent ici l'expression sincère de ma très profonde reconnaissance.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à M. le Pr Jacques C. Senez qui a contribué à m'orienter vers la recherche.

## SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	6
RESUME .....	10
ABSTRACT.....	10
LISTE DES FIGURES .....	11
LISTE DES TABLEAUX .....	12
INTRODUCTION GENERALE.....	15
1. LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE.....	15
2. LES MICRO-ORGANISMES FIXATEURS D'AZOTE .....	16
3. LA FAMILLE DES LEGUMINEUSES .....	17
4. LES UTILISATIONS DES LEGUMINEUSES.....	17
5. LES ENGRAIS VERTS EN AGRICULTURE TROPICALE.....	17
6. LES LEGUMINEUSES A NODULES DE TIGE.....	18
7. PRESENTATION DU MEMOIRE.....	18
CHAPITRE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
1. TAXONOMIE DES RHIZOBIA.....	21
2. INFECTION ET DEVELOPPEMENT DES NODULES.....	26
2. 1 Infection par l'intermédiaire des poils absorbants.....	26
2. 2 Autres modes d'infection des racines des légumineuses .....	27
2. 3 Processus d'infection chez les légumineuses à nodules caulinaires....	28
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	31
1. SOUCHES BACTERIENNES .....	31
1. 1 Isolement des rhizobia contenus dans les nodules .....	31
1. 2 Souches isolées de nodules de tiges et de racines d'Aeschynomènes .	31
1. 3 Souches bactériennes de référence et autres souches utilisées	
en taxonomie.....	31
2. PLANTES .....	31
3. MILIEUX DE CULTURE.....	35
3. 1 Milieux de culture des rhizobia.....	35
3.1.1 Milieu YM.....	35
3.1. 2 Milieu minimal pour la fixation d'azote <i>in vitro</i> (SA) .....	35
3.1. 3 Milieu SAG.....	35
3. 2 Milieux de culture pour les plantes.....	35
3.2.1 Milieu de Jensen.....	35
3. 2. 2 Milieu de culture des plantes en présence	
d'azote combiné .....	35
4. METHODES DE CULTURE DES RHIZOBIA .....	35
4. 1 Culture asymbiotique en milieu faiblement gélosé .....	35
4. 2 Culture asymbiotique en milieu liquide.....	36
5. METHODES DE CULTURE ET INOCULATION DES PLANTES .....	36
5. 1 Stérilisation et germination des graines.....	36

5. 2 Cultures hydroponiques.....	36
5.2.1 Tubes de Gibson .....	36
5.2.2 Culture des plantes en présence d'azote combiné.....	36
5.2.2.1 Effet du nitrate sur l'activité nitrogénase des nodules préexistants.....	37
5.2.2.2 Effet du nitrate sur la formation et l'activité nitrogénase des nodules.....	37
5. 3 Culture des plantes dans les conditions du champ .....	37
5.3.1 Cultures sur sol en vase de végétation ou en microparcelles.....	37
5.3.2 Cultures en présence d'azote combiné. ....	37
5.3.3 Effet du phosphore et du potassium sur la croissance et la fixation d'azote.....	37
5. 4 Culture du riz en microparcelles - Effet de l'engrais vert.....	39
5. 5 Inoculation des plantes .....	39
6. METHODES DE DOSAGE .....	40
6. 1 Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) .....	40
6. 2 Dosage de l'azote total.....	40
6. 3 Dosage des protéines .....	40
6. 4 Analyses de l'essai engrais vert.....	40
7. HISTOLOGIE.....	41
7. 1 Microscopie électronique.....	41
7. 2 Microscopie photonique.....	41
7. 3 Observation du nucléoïde des bactéroïdes .....	41
8. ETUDE TAXONOMIQUE DES RHIZOBIA ISOLES D' <i>AESCHYNOMENE</i> .....	41
8. 1 Taxonomie numérique.....	41
8.1.1 Caractères morphologiques .....	41
8.1.2 Caractères physiologiques.....	42
8.1.3 Caractères biochimiques.....	42
8.1.4 Etude nutritionnelle .....	42
8. 2 Taxonomie moléculaire.....	42
8.2.1 Détermination du G + C % .....	43
8.2.2 Hybridation ADN:ARN ribosomal 16s.....	43

### CHAPITRE III: LA NODULATION CAULNAIRE DANS LE GENRE

<i>AESCHYNOMENE</i> .....	45
1. INTRODUCTION.....	45
2. MISE EN EVIDENCE DE GROUPE D'INOCULATION CROISEE DANS LE GENRE <i>AESCHYNOMENE</i> .....	46
3. STRUCTURE ANATOMIQUE DES SITES DE NODULATION DES DIFFERENTES ESPECES D' <i>AESCHYNOMENE</i> .....	48
3. 1 Méthodologie.....	48
3. 2 Résultats et discussion .....	48

### CHAPITRE IV : LA SYMBIOSE ENTRE *RHIZOBIUM* ET *AESCHYNOMENE*

<i>AFRASPERA</i> .....	51
1. INTRODUCTION.....	51
2. INOCULATION ET NODULATION DES TIGES D'A. <i>AFRASPERA</i> .....	51
3. ESTIMATION DU POTENTIEL FIXATEUR D'AZOTE D'A. <i>AFRASPERA</i> .....	52

3. 1	Activité réductrice d'acétylène des nodules de tige et de racines d' <i>A. afraspera</i> .....	52
3. 2	Estimation de la fixation d'azote par la méthode des différences .....	54
3. 3	Discussion .....	54
4.	EFFET DE L'AZOTE COMBINÉ SUR LA NODULATION ET LA FIXATION DE L'AZOTE CHEZ <i>A. AFRASPERA</i> .....	56
4.1	Introduction .....	56
4. 2	Résultats .....	56
4.2.1	Effet de l'azote combiné sur les cultures hydroponiques d' <i>A. afraspera</i> .....	56
4.2.2	Effet de l'urée sur le potentiel fixateur d'azote d' <i>A. afraspera</i> cultivée au champ .....	59
4.2. 3	Effet du phosphore et du potassium.....	59
4. 3	Discussion .....	59
5.	APPLICATIONS AGRONOMIQUES.....	62
5. 1	Introduction.....	62
5. 2	Résultats .....	62
5. 2. 1	Productivité de l'engrais vert .....	62
5. 2. 2	Effet engrais vert.....	62
5. 3	Discussion .....	62
CHAPITRE V : DEVELOPPEMENT DES NODULES CAULINAIRES CHEZ <i>AESCHYNOMENE AFRASPERA</i> .....		67
1.	INTRODUCTION.....	67
2.	STRUCTURE ANATOMIQUE DES SITES DE NODULATION SUR LES TIGES D' <i>A. AFRASPERA</i> .....	67
3.	INFECTION DU SITE DE NODULATION.....	68
3. 1	Pénétration des rhizobia .....	68
3. 2	Infection intracellulaire .....	68
4.	PROPAGATION DE L' INFECTION.....	68
5.	INFECTION DU MERISTEME NODULAIRE.....	69
6.	DEVELOPPEMENT DU NODULE.....	69
7.	INFECTION SECONDAIRE DU SITE DE NODULATION.....	70
8.	DISCUSSION .....	70
CHAPITRE VI : FIXATION D' AZOTE <i>IN VITRO</i> PAR LES RHIZOBIA D' <i>AESCHYNOMENE</i> .....		73
1.	INTRODUCTION.....	73
2.	RESULTATS .....	74
2. 1	Activité nitrogénase des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> cultivés en milieu faiblement gélosé.....	74
2. 2	Activité nitrogénase et croissance des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> cultivés en milieu liquide en absence d'azote combiné.....	77
3.	DISCUSSION .....	77
CHAPITRE VII : ETUDE TAXONOMIQUE DES RHIZOBIA D' <i>AESCHYNOMENE</i> .		81
1.	INTRODUCTION.....	81
2.	RESULTATS .....	81
2.1	Analyse numérique des caractères phénotypiques .....	81

2. 2 Taxonomie moléculaire.....	82
3. DISCUSSION .....	89
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
ANNEXE : PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES.....	111

## RESUME

Plusieurs espèces de légumineuses appartenant au genre *Aeschynomene* présentent, comme *Sesbania rostrata*, la particularité de porter des nodules fixateurs d'azote à la fois sur leurs racines et sur leur tige.

Une étude de la spécificité de nodulation des souches d'*Aeschynomene* originaires de l'Afrique de l'Ouest a permis de distinguer trois groupes d'inoculation croisée dans le genre *Aeschynomene*.

Les espèces d'*Aeschynomene* à nodules caulinaires sont caractérisées par la présence sur leur tige de sites de nodulation prédéterminés, constitués par des ébauches racinaires adventives.

Chez *A. afraspera*, l'infection par le rhizobium spécifique a lieu directement dans les cellules corticales situées au fond de la cavité annulaire dégagée autour du primordium racinaire. L'infection se propage en profondeur, par dégénérescence successive des cellules infectées, jusqu'à une zone méristématique préalablement induite à distance. Le nodule se développe ensuite par division des cellules méristématiques infectées. Le processus d'infection ne fait intervenir ni poils absorbants, ni de cordons d'infection.

La plupart des rhizobia isolés des nodules caulinaires sont capables de fixer l'azote atmosphérique *in vitro* en cultures gélosées ou en cultures liquides sous de faibles tensions d'oxygène (0,5 %).

L'étude taxonomique de ces rhizobia les classe dans le genre *Bradyrhizobium*.

Sur le plan des applications agronomiques, les potentialités de fixation d'azote considérables (50 g N fixé/m<sup>2</sup>/60 jours) d'*A. afraspera* ou d'*A. nilotica* permettent leur utilisation comme engrais vert en riziculture irriguée. Les rendements en riz ont pu être doublés dans des essais en microparcelles. De plus, la fixation d'azote par les nodules caulinaires n'est pas inhibée par l'azote combiné présent dans le sol.

## ABSTRACT

A few leguminous species belonging to the tropical genus *Aeschynomene* are able to form nitrogen-fixing nodules both on stems and roots. *Aeschynomene* spp. can be divided into three cross-inoculation groups.

Rhizobial infection occurs on the stem of *A. afraspera* via direct invasion of cortical cells at the site of emergence of adventitious root primordia.

All rhizobia isolated from stem-nodulating species are able to develop nitrogenase activity *ex planta* in the presence or in the absence of combined nitrogen.

A taxonomic study classifies these rhizobial strains in the genus *Bradyrhizobium*.

Because of the very high nitrogen-fixing potential of stem nodulated *Aeschynomene* spp., these plants can be successfully used as green manure in rice cultivation, increasing the rice grain yield by 80 %. Furthermore, nitrogen fixation is not inhibited by combined nitrogen of the soil.



## LISTE DES FIGURES

	page
CHAPITRE IV: La symbiose entre <i>Rhizobium</i> et <i>Aeschynomene</i>	
Figure 1: Effet du nitrate sur l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires et racinaires d' <i>Aeschynomene afraspera</i> .....	57
Figure 2: Effet du phosphore et du potassium sur la production de biomasse et la fixation d'azote par <i>A. afraspera</i> .....	61
CHAPITRE VI: Fixation d'azote <i>in vitro</i> par les rhizobia d' <i>Aeschynomene</i>	
Figure 3: Cinétique de l'activité nitrogénase d' <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571, des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> ORS310 et ORS322, et de la souche <i>Bradyrhizobium</i> CB756 cultivés en milieu faiblement gélosé en absence ou en présence de 3 mM de glutamate .....	76
Figure 4: Cinétique de l'activité nitrogénase d' <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571 et des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> ORS310 et ORS322 cultivés en milieu liquide en absence d'azote combiné.....	78
CHAPITRE VII: Etude taxonomique des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i>	
Figure 5: Dendrogramme des souches de rhizobia basé sur les données de l'analyse numérique des tests morphologiques, physiologiques et nutritionnels.....	87
Figure 6: Représentation sous la forme d'une matrice ombragée des coefficients de similitude des souches de rhizobia calculés à partir de l'analyse de taxonomie numérique.....	88

## LISTE DES TABLEAUX

	page
CHAPITRE I: Synthèse bibliographique	
Tableau 1: Taxonomie des <i>Rhizobiaceae</i> .....	24
Tableau 2: Famille IV ARN-r .....	25
CHAPITRE II: Matériel et méthodes	
Tableau 3: Caractéristiques des souches de rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> .....	32
Tableau 4: Souches bactériennes utilisées pour la taxonomie.....	33
Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des sols de Bel-Air et de Cambérène.....	38
CHAPITRE III: La nodulation caulinaire dans le genre <i>Aeschynomene</i>	
Tableau 6: Spécificité et efficience des souches de rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> .....	47
CHAPITRE IV: La symbiose entre <i>Rhizobium</i> et <i>Aeschynomene afraspera</i>	
Tableau 7: Activité réductrice d'acétylène (ARA) des nodules de tiges et de racines d' <i>A. afraspera</i> .....	53
Tableau 8: Effet de l'inoculation des tiges sur la croissance et la teneur en azote des plantes d' <i>A. afraspera</i> .....	55
Tableau 9: Effet du nitrate sur la fixation de l'azote et la croissance d' <i>A. afraspera</i> en cultures hydroponiques.....	58
Tableau 10: Effet de différentes doses d'urée sur la fixation d'azote et la croissance d' <i>A. afraspera</i> cultivée en vases de végétation.....	60
Tableau 11: Productivité végétale et teneur en azote des <i>Aeschynomènes</i> après 7 semaines de culture .....	63
Tableau 12: Effet de l'engrais vert <i>Aeschynomene</i> sur la production et la teneur en azote du riz.....	64
CHAPITRE VI: Fixation d'azote <i>in vitro</i> par les rhizobia d' <i>Aeschynomene</i>	
Tableau 13: Caractéristiques et activité nitrogénase <i>ex planta</i> des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i> après 7 jours de culture en milieu gélosé semi-solide.....	75

Tableau 14: Activité nitrogénase et estimation de la croissance des souches ORS310, ORS322, et ORS571 après 6 jours de culture.....	79
CHAPITRE VII: Etude taxonomique des rhizobia d' <i>Aeschynomene</i>	
Tableau 15: Principales caractéristiques permettant de différencier les souches de <i>Rhizobium</i> , d' <i>Azorhizobium</i> et de <i>Bradyrhizobium</i> .....	83
Tableau 16: Composition en bases et hybridation de l'ADN des souches d' <i>Aeschynomene</i> avec l'ARN ribosomal 16s marqué des souches de référence.....	89



## INTRODUCTION GENERALE

L'azote est, après l'eau, le facteur limitant le plus fréquent de la production agricole. Bien que l'azote moléculaire soit un constituant majeur de l'atmosphère terrestre, la molécule d'azote, chimiquement inerte, n'est pas assimilable par la plupart des formes vivantes. Les plantes supérieures, comme tous les organismes eucaryotes et la plus grande majorité des micro-organismes dépendent de l'azote combiné, minéral ou organique, pour leur nutrition azotée.

Les besoins en azote des plantes cultivées sont considérables. Par exemple, une récolte de riz de 4 tonnes par hectare nécessite l'apport de 80 kg d'azote (Patnaik et Rao, 1979). L'azote assimilé par les plantes a pour origine : les réserves du sol, les engrais apportés par les agriculteurs ou la fixation biologique de l'azote.

L'azote indispensable à la croissance des végétaux est rarement présent en quantité suffisante dans le sol. Aussi, les apports d'azote directement assimilable par les plantes sont-ils nécessaires pour maintenir la fertilité des sols. Actuellement, l'apport d'engrais azotés est estimé à 100 millions de tonnes par an. L'utilisation des engrais azotés n'est cependant pas sans inconvénients. En utilisation intensive, seule une partie de l'engrais est assimilée par les plantes et l'excédent, par suite du lessivage par les eaux de pluie peut contribuer à la pollution des eaux par eutrophisation. De plus, leur coût de fabrication, dépendant de celui de l'énergie, ne cesse d'augmenter jusqu'à être inaccessible pour les paysans des pays pauvres du monde.

Les pays en voie de développement, localisés pour la plupart dans la zone tropicale aride ou semi-aride, sont confrontés à un déficit alimentaire chronique qui constitue l'un des problèmes les plus cruciaux en cette fin de siècle. L'augmentation des besoins alimentaires, résultant de l'explosion démographique que connaissent ces pays, a provoqué une sur-exploitation des zones agricoles et pastorales dont l'aboutissement, dans un système de monoculture à utilisation minimale d'intrants, est la dégradation et l'appauvrissement actuels des sols. Cette situation est encore aggravée par le déficit hydro-pluviométrique qui, en limitant la germination des espèces herbacées livre la mince couche arable du sol à l'érosion par le vent.

Augmenter la productivité agricole tout en réduisant sa dépendance vis-à-vis des engrais azotés, tel est l'objectif des nombreuses recherches fondamentales et appliquées sur les systèmes biologiques fixateurs d'azote.

### 1. LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

Si les végétaux supérieurs sont incapables d'utiliser l'azote atmosphérique, certains micro-organismes du sol possèdent l'équipement enzymatique leur permettant de le métaboliser pour leurs synthèses protéiques. La fixation biologique de l'azote, c'est-à-dire la réduction enzymatique de l'azote moléculaire en ammoniacque, est l'un des processus fondamentaux parmi les cycles biologiques se déroulant dans le sol. C'est l'activité des micro-organismes fixateurs d'azote qui, en compensant les pertes d'azote dues à la dénitrification et au lessivage, assure le maintien du stock azoté à un niveau constant dans la biosphère. L'azote fixé sous une forme organique, protéique, ne deviendra cependant utilisable par les végétaux qu'après ammonification et nitrification.

La quantité d'azote fixé annuellement dans le monde par voie biologique est estimée à 175 millions de tonnes, valeur à laquelle il faut ajouter environ 40 millions de tonnes résultant de la fixation par des phénomènes physiques naturels tels que les radiations cosmiques ou lumineuses, l'ozonisation, et les éruptions volcaniques (Hardy et Havelka, 1975).

## 2. LES MICRO-ORGANISMES FIXATEURS D'AZOTE

Tous les micro-organismes fixateurs d'azote, ou diazotrophes, sont des procaryotes regroupant plus de 200 espèces bactériennes (Postgate, 1981), dont la moitié environ sont des Cyanobactéries (Stewart, 1980). Toutes ces espèces ont en commun le même complexe enzymatique, la nitrogénase, qui en absence d'oxygène, catalyse la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ce complexe enzymatique est formé de deux protéines. La protéine I est un tétramère formé de deux types de sous-unités, et la protéine II est un dimère formé d'un seul type de sous-unité. Il existe une homogénéité remarquable dans la structure des nitrogénases extraites des différentes espèces de micro-organismes fixateurs d'azote (Emerich et Burris, 1978; Eady et Smith, 1979). Toutes les nitrogénases sont irréversiblement inactivées par l'oxygène. Les espèces bactériennes qui fixent l'azote en aérobiose ont donc dû développer, pour protéger leur nitrogénase, soit des structures spécialisées, soit des mécanismes physiologiques plus ou moins élaborés. Par exemple, les cyanobactéries filamenteuses différencient une cellule spécialisée, l'hétérocyste, dans laquelle le photosystème II, responsable de la photolyse de l'eau, ne fonctionne pas. (Stewart *et al.*, 1969). Le second facteur fait intervenir une régulation de nature génétique. Si l'azote moléculaire n'est pas inhibiteur de la nitrogénase, en revanche, la nature et la concentration de la source d'azote dans le milieu influent sur la biosynthèse de l'enzyme. Les ions ammonium et les composés azotés organiques simples facilement assimilables ont toujours un effet répresseur sur la biosynthèse de la nitrogénase.

On distingue généralement deux groupes de micro-organismes diazotrophes, en fonction de leur relation avec les plantes:

- les bactéries fixatrices d'azote "libres" c'est-à-dire non associées aux plantes. Ces espèces bactériennes appartiennent aux genres *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, aux bactéries photosynthétiques et aux Cyanobactéries.
- les bactéries symbiotiques capables d'établir, avec les plantes, une association à bénéfices réciproques ou symbiose, dans laquelle, le partenaire végétal fournit le carbone et l'énergie (produits de la photosynthèse) et le partenaire bactérien fournit l'azote fixé par l'intermédiaire de sa nitrogénase. Les symbioses les plus étudiées en raison de leur intérêt agronomique ou fondamental sont les suivantes:
  - la symbiose entre la cyanobactérie *Anabaena* et la fougère aquatique *Azolla* (engrais vert en riziculture),
  - la symbiose entre l'actinomycète *Frankia* et les non-légumineuses (par exemple *Casuarina* pour la stabilisation des sols en zone tropicale),
  - la symbiose *Rhizobium*-légumineuse,
  - la symbiose entre *Rhizobium* et la seule non-légumineuse connue à ce jour, *Parasponia* (Ulmacée).

Il faut remarquer que certains fixateurs libres vivant dans la rhizosphère sont également capables de s'associer aux systèmes racinaires sans former des structures différenciées. C'est le cas, en particulier, pour les *Azospirillum* avec les graminées.

### 3. LA FAMILLE DES LEGUMINEUSES

La fixation biologique de l'azote est un processus coûteux en énergie. Les études de fonctionnement *in vitro* de la nitrogénase montrent que 12 à 15 molécules d'ATP sont nécessaires pour réduire une molécule de  $N_2$  (Shanmugan *et al.*, 1978). Il n'est donc pas surprenant que les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces soient ceux qui réalisent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse. Ainsi, la symbiose entre les rhizobia et les légumineuses, qui se manifeste par la formation de nodules fixateurs d'azote sur les systèmes racinaires de ces plantes, est responsable de près de la moitié de la quantité de l'azote fixé annuellement à la surface du globe terrestre (Hardy et Havelka, 1975).

La famille des Légumineuses (ordre des Rosales) constitue l'un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés. Cette famille comprend trois sous-familles (Polhill *et al.*, 1981):

- les **Césalpinacées**, qui comprennent environ 180 genres et 2000 espèces, sont constituées essentiellement d'arbres et d'arbustes des régions tropicales dont quelques uns sont utilisés pour leur bois précieux (*Azadirachta*), le contenu de leur écorce en alcaloïdes ou en tanins (*Erythrophloeum*, *Caesalpinia*), leur propriété purgative (*Cassia*, *Tamarindus*) ou leurs fruits comestibles (caroubier).
- les **Mimosacées** comprenant 65 genres et 2900 espèces sont pour la plupart des arbres et arbustes des régions intertropicales (*Acacia*, *Albizia*, *Inga*, *Leucaena*, etc). Certaines espèces jouent un grand rôle comme fourrage dans les zones semi-désertiques de Sahel ou pour la production de gomme arabique.
- les **Papilionacées** comprennent plus de 482 genres et 14000 espèces réparties sur tout le globe. Ce sont surtout des plantes herbacées des régions tropicales ou tempérées, parmi lesquelles figurent de nombreuses plantes cultivées pour leur valeur nutritionnelle.

### 4. LES UTILISATIONS DES LEGUMINEUSES

Les légumineuses cultivées ont toujours occupé une place importante dans la plupart des systèmes agraires. Elles sont une source essentielle de protéines, soit par les graines pour l'alimentation humaine (fève, haricot, pois, soja, vesce, arachide, niébé), soit comme fourrage pour l'alimentation animale (luzerne, sainfoin, trèfle). Il faut noter que le soja, premier oléagineux du monde et dont le tourteau fait l'objet d'un commerce important, représente à lui seul les deux tiers de la production mondiale des légumineuses à graines.

Une autre forme d'utilisation des légumineuses est la culture de certaines espèces comme fertilisants des sols. Les effets bénéfiques de la culture des légumineuses sur la production agricole sont connus depuis l'Antiquité et aujourd'hui encore, elles sont régulièrement insérées dans les rotations céréalières. Dans les sols cultivés, les engrais azotés et les légumineuses sont les deux principales sources qui permettent de maintenir la teneur en azote d'un sol malgré les exportations provoquées par les récoltes.

### 5. LES ENGRAIS VERTS EN AGRICULTURE TROPICALE

En zone tropicale, le niveau de la production agricole est, dans la plupart des cas, étroitement dépendant de la richesse naturelle des sols en éléments minéraux indispensables aux cultures de céréales comme le riz, le maïs, le mil ou le sorgho, qui constituent les aliments de base des populations locales. Ces cultures épuisent rapidement les sols bien souvent déjà très pauvres en azote et en phosphore. L'utilisation des engrais chimiques importés, qui serait nécessaire dans ces conditions, est limitée par leur coût, trop onéreux par rapport aux

ressources financières de la majorité des agriculteurs. Aussi, utiliser comme engrais des légumineuses ayant un potentiel fixateur d'azote élevé, présente-t-il de nombreux avantages.

La pratique des engrais verts est parfaitement bien intégrée dans les pratiques culturales traditionnelles en Inde ou en Asie du Sud-Est. Les espèces utilisées sont, outre *Azolla*, des légumineuses appartenant aux genres *Astragalus*, *Sesbania*, *Crotalaria* ou *Medicago* (Patnaik et Rao, 1979). L'espèce la plus fréquemment utilisée est *Astragalus sinicus* cultivée pendant l'hiver et incorporée dans le sol 20 jours avant le repiquage du riz, à raison de 20 à 30 tonnes de matière fraîche représentant 100 kg d'azote par hectare.

En Afrique, les engrais verts sont encore peu utilisés. C'est pourtant là que poussent certaines légumineuses, qui grâce à la présence de nodules fixateurs d'azote sur leur tige, sont capables de fixer des quantités d'azote beaucoup plus importantes que celles fixées par les légumineuses traditionnellement utilisées comme engrais vert dans la riziculture en Asie.

## 6. LES LEGUMINEUSES A NODULES DE TIGE

La mise en évidence de propriétés fixatrices d'azote exceptionnelles chez une légumineuse tropicale, *Sesbania rostrata* par Dreyfus et Dommergues (1981) a été à l'origine de très nombreux travaux dans des laboratoires du monde entier, aussi bien sur le plan fondamental que sur celui des applications agronomiques.

Cette légumineuse qui pousse dans les sols tropicaux inondés d'Afrique et d'Asie, présente la particularité remarquable de porter des nodules fixateurs d'azote non seulement sur ses racines mais également sur ses tiges (planche I, figure 1). La présence de nodules caulinaires permet à cette plante de porter cinq à dix fois plus de nodules que n'importe quelle autre légumineuse et d'être capable de fixer jusqu'à 200 kg par hectare en deux mois de culture (Dreyfus, 1982).

Sur le plan fondamental, le rhizobium impliqué dans la symbiose caulinaire avec *Sesbania rostrata* présente la propriété unique pour un rhizobium d'être capable non seulement d'exprimer *in vitro* une activité fixatrice d'azote très élevée, comparable à celle de *Klebsiella pneumoniae*, mais aussi, comme un fixateur libre, d'assimiler l'azote gazeux fixé pour sa propre croissance (Dreyfus *et al.*, 1983; Gebhardt *et al.*, 1984). Une nouvelle voie d'approche de l'étude génétique des bactéries symbiotiques était ainsi ouverte grâce à l'utilisation de mutants pouvant être sélectionnés directement sur des milieux dépourvus d'azote combiné (Elmerich *et al.*, 1982).

L'aptitude à former des nodules caulinaires n'est pas restreinte à la seule espèce *S. rostrata*. Il existe d'autres légumineuses sauvages à nodules caulinaires que l'on rencontre dans la zone intertropicale. Ces plantes appartiennent au genre *Aeschynomene* qui, à la différence du genre *Sesbania*, renferme plusieurs espèces présentant des nodules sur leur tige. Ces plantes et leurs rhizobia associés font l'objet des travaux présentés dans ce mémoire.

## 7. PRESENTATION DU MEMOIRE

L'étude que nous présentons porte sur les légumineuses tropicales appartenant au genre *Aeschynomene*, avec un intérêt plus particulier pour les espèces à nodulation caulinaire.

Plusieurs aspects de la symbiose seront abordés. Nous présenterons tout d'abord une classification des *Aeschynomènes* originaires de l'Afrique de l'Ouest selon leur spécificité d'hôte c'est-à-dire leur aptitude à être nodulées par différentes souches de rhizobium (Alazard, 1985). Nous établirons aussi une classification de ces mêmes espèces en fonction de la structure des sites de nodulation qu'elles portent sur leur tige (Alazard et Duhoux, 1988).



Nous nous intéresserons ensuite à l'espèce *Aeschynomene afraspera* qui, à notre avis, présente les plus grandes potentialités sur le plan des applications agronomiques (Alazard et Becker, 1987). Nous estimerons son potentiel fixateur d'azote et nous étudierons l'influence de certains facteurs du milieu comme la présence d'azote combiné sur la nodulation et la fixation de l'azote par cette espèce (Alazard et Duhoux, 1987; Becker *et al.*, 1986).

Nous aborderons ensuite l'étude du processus d'infection et de développement des nodules caulinaires chez *A. afraspera* et nous comparerons ce mode d'infection à ceux décrits jusqu'à présent dans la littérature (Alazard et Duhoux, 1990).

L'étude physiologique de quelques rhizobia d'*Aeschynomene* à nodules de tige nous permettra de mettre en évidence, non seulement leur capacité de fixer l'azote en culture sous de faibles tensions d'oxygène, mais aussi comme les fixateurs libres et *Azorhizobium caulinodans*, leur capacité de se développer aux dépens de l'azote fixé en culture (Alazard, 1990). Cette propriété exceptionnelle nous conduira naturellement à nous interroger sur la position taxonomique des rhizobia d'*Aeschynomene* parmi les autres Rhizobiacées.

Auparavant, nous nous proposons de rappeler, dans une synthèse bibliographique, les connaissances actuelles concernant quelques uns des aspects de la symbiose qui vont être abordés ici, en particulier ceux concernant la taxonomie des rhizobia et les différents processus conduisant à la formation des nodules.



## CHAPITRE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. TAXONOMIE DES RHIZOBIA

Les bactéries appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*, communément appelées rhizobia, constituent avec les genres *Agrobacterium* et *Phyllobacterium* la famille des *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984).

Toutes ces bactéries sont impliquées dans des interactions spécifiques avec les plantes. Le genre *Agrobacterium* comprend des espèces bactériennes phytoparasites comme *A. tumefaciens*, responsable de la formation de tumeurs sur le collet des plantes. Quant aux bactéries du genre *Phyllobacterium*, elles sont présentes dans les nodules foliaires de certaines Myrsinacées et Rubiacées (*Pavetta*, *Psychotria*).

Les rhizobia sont des bactéries du sol, aérobies strictes, Gram-négatives, non sporulées, en forme de bâtonnets de 0,5 à 0,9 µm de large sur 1,2 à 3 µm de long. Ils possèdent la propriété spécifique d'être capables d'induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les systèmes racinaires de très nombreuses légumineuses et sur celui d'une seule non-légumineuse connue à ce jour, *Parasponia* (Ulmacée).

La première subdivision en espèces des rhizobia, longtemps regroupés dans un seul genre, *Rhizobium*, découle du concept de groupe d'inoculation croisée. Ce concept, énoncé par Fred *et al.* (1932), repose sur l'existence d'une spécificité des rhizobia vis-à-vis de la plante hôte, spécificité liée à la fois au pouvoir de nodulation du rhizobium (infectivité) et à son aptitude à former des nodules fixateurs d'azote (efficacité). Un groupe d'inoculation croisée de légumineuses est constitué par l'ensemble des plantes hôtes nodulées par les mêmes souches bactériennes; une espèce de *Rhizobium* étant définie comme l'ensemble des souches infectives sur les plantes appartenant à un même groupe d'inoculation croisée. Cette classification originale reconnaissait six groupes et leur espèce correspondante: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* et *R. japonicum*. Les autres bactéries, associées à des groupes (dix) mal définis de légumineuses tropicales de genres très divers, furent nommées *Rhizobium* sp., et leur groupe, "cowpea", nom usuel anglais du genre *Vigna* (Niébé).

Si cette classification est utile pour les agronomes puisqu'on y retrouve les principales légumineuses cultivées, son principe a été très rapidement remis en question en raison de nombreuses anomalies constatées dans les spectres d'hôte des rhizobia, à mesure que le nombre de souches testées augmentait.

En règle générale, les rhizobia se répartissent en deux groupes d'après leur vitesse de croissance. Le groupe des rhizobia à croissance rapide qui forment des colonies bien développées sur milieu solide après trois à cinq jours de culture, comprend les rhizobia associés aux Pois, Trèfle, Luzerne et Haricot. Le groupe des rhizobia à croissance lente qui nécessitent sept à dix jours de culture pour atteindre le maximum de leur développement, comprend les rhizobia associés aux Soja, Lupin et Niébé (cowpea). En outre, les rhizobia à croissance rapide ont, en général, la propriété d'acidifier leur milieu de culture, tandis que les souches à croissance lente ont tendance à alcaliniser le milieu sur lequel elles se développent.

Norris (1965), en conclusion d'une étude de la production d'acide par 717 souches de rhizobia, émettait l'hypothèse, très controversée, que la forme primitive des rhizobia était la forme à croissance lente, productrice d'alcali, associée aux légumineuses d'origine tropicale où

les sols sont généralement acides. Les rhizobia à croissance rapide, représentant une forme plus évoluée qui se serait adaptée aux sols fertiles et à pH plus élevés des zones tempérées.

La méthode de taxonomie numérique établie par Adanson (1763) qui donne un poids égal à chaque caractère phénotypique bien défini et non redondant, évitant ainsi la spéculation théorique autour de certains caractères dits "importants" affectés d'un poids arbitrairement plus élevé, a été utilisée par plusieurs auteurs (Graham, 1964a ; Moffett et Colwell, 1968 ; 'T Mannetje, 1967). Ces travaux mirent en évidence d'une part que les espèces *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. trifolii* étaient voisines et ne devaient constituer qu'une seule espèce, et d'autre part, que les rhizobia à croissance lente formaient un groupe distinct de celui des rhizobia à croissance rapide; ces derniers présentant, en outre, de nombreuses similitudes avec le genre *Agrobacterium*.

Il existe des différences importantes de nutrition carbonée entre les deux types de rhizobia. Les espèces à croissance rapide sont capables de métaboliser une grande variété d'hexoses, de pentoses, de disaccharides, de trisaccharides et d'acides organiques, tandis que les espèces à croissance lente sont incapables de métaboliser la plupart des disaccharides, des trisaccharides, et des acides organiques (Graham, 1964b). Les données de la littérature concernant le métabolisme des carbohydrates sont parfois contradictoires (Stowers, 1985). Il est possible, cependant, d'en tirer quelques caractéristiques biochimiques pour chacun des deux groupes. Les enzymes-clés des trois voies métaboliques impliquées dans la dégradation des hexoses ont été mises en évidence chez les espèces à croissance rapide. En revanche, chez les espèces à croissance lente, la voie des pentoses phosphates n'a jamais été mise en évidence; ces espèces ne possédant pas l'enzyme 6-phosphogluconate déshydrogénase NAD-dépendante (Martinez-De Drets et Arias, 1972).

De Ley et Rassel (1965) examinèrent la composition en bases de l'ADN (% Guanine+Cytosine) des rhizobia et montrèrent une relation étroite avec le type de flagellation. Les rhizobia à croissance rapide possèdent deux à six flagelles péritriches et une composition en G+C variant entre 58,6 et 63,1 %. Les rhizobia à croissance lente ont un G+C % compris entre 62,8 et 65,5 et présentent une flagellation polaire ou subpolaire.

En 1969, Graham, analysant les résultats de plusieurs études sérologiques, définit trois groupes sérologiques:

1. *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli*
2. *R. meliloti*
3. *R. japonicum* et *R. lupini*.

Ces groupes sérologiques correspondaient aux groupes définis par l'étude de taxonomie numérique de Graham (1964a).

Les études des homologues ADN:ADN (Crow *et al.*, 1981 ; Gibbons et Gregory, 1972; Heberlein *et al.*, 1967; Hollis *et al.*, 1981; Jarvis *et al.*, 1980) et l'électrophorèse à deux dimensions des protéines cellulaires (Roberts *et al.*, 1980) confirmèrent ces regroupements de souches. L'ensemble de ces résultats aboutit à une nouvelle révision du genre *Rhizobium*.

Dans la 1<sup>ère</sup> édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology publiée en 1984, Jordan sépare les rhizobia en deux genres selon leur vitesse de croissance sur le milieu mannitol+extrait de levure (Vincent, 1970). Le genre *Rhizobium* comprend les rhizobia à croissance rapide, dont le temps de doublement est compris entre une et quatre heures, qui acidifient leur milieu de culture et, le plus souvent sont associés aux légumineuses tempérées. Les rhizobia à croissance lente, dont le temps de doublement est supérieur à six heures, qui provoquent une alcalinisation de leur milieu de culture et sont généralement associés aux légumineuses tropicales, constituent le genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982).

Le genre *Rhizobium* comprend trois espèces : *R. leguminosarum*, *R. meliloti* et *R. loti*; l'espèce *R. leguminosarum* renfermant trois biovars (*R. leguminosarum* biovar *trifolii*, *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* et *R. leguminosarum* biovar *viceae*). Depuis lors, deux nouvelles espèces ont été créées:

- *R. fredii*, qui regroupe l'ensemble des rhizobia à croissance rapide, isolés de nodules de soja cultivé en Chine (Keyser *et al.*, 1982; Scholla et Elkan, 1984). Il a été proposé, par la suite, d'élever cette espèce au rang d'un nouveau genre *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988).

- *R. galegae* pour les rhizobia isolés de *Galega orientalis* et de *G. officinalis* (Lindström, 1989).

Le genre *Bradyrhizobium* est constitué par une seule espèce, *Bradyrhizobium japonicum*, qui regroupe l'espèce originale *R. japonicum* et les rhizobia à croissance lente du groupe cowpea. Bien que trois groupes d'homologie d'ADN aient été mis en évidence dans l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Hollis *et al.*, 1981), aucune nouvelle espèce n'a, à ce jour, été nommée.

Un nouveau genre a été créé pour les rhizobia isolés des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*. Ces rhizobia présentent *in vitro* une activité réductrice d'acétylène extrêmement élevée et possèdent la propriété unique, parmi les rhizobia, d'être capables d'utiliser les produits de la fixation d'azote comme seule source d'azote pour leur croissance (Dreyfus *et al.*, 1983; Gebhardt *et al.*, 1984). Ces rhizobia, dont l'espèce type est *Azorhizobium caulinodans*, sont phylogénétiquement apparentés au genre *Xanthobacter* (Dreyfus *et al.*, 1988).

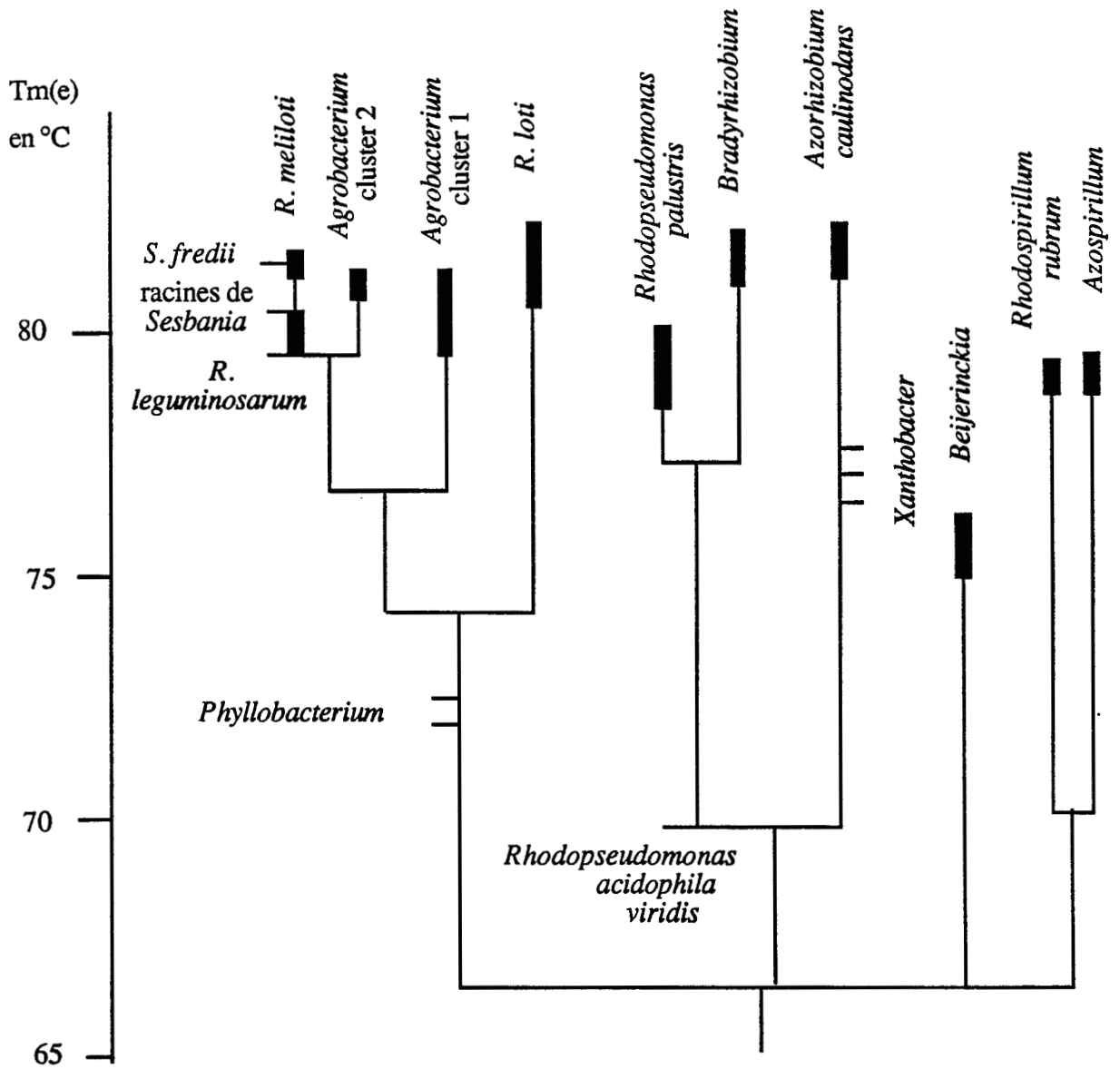
En ce qui concerne les rhizobia impliqués dans la symbiose caulinaire établie avec quelques espèces de légumineuses tropicales appartenant au genre *Aeschynomene*, *A. scabra* et *A. aspera*, leur position taxonomique n'est jusqu'à présent pas définie avec précision. Ils présentent des caractéristiques, à la fois des *Rhizobium* et des *Bradyrhizobium* typiques (Stowers et Eaglesham, 1983; Chakrabarti *et al.*, 1986). Le tableau 1 résume la classification actuelle des *Rhizobiaceae*.

Les techniques de taxonomie moléculaire telles que les hybridations ADN : ADN et ADN : ARN ribosomal, qui permettent d'étudier la structure fine d'une espèce et ses relations phylogéniques avec les autres espèces sont, de nos jours, largement utilisées. Les homologies ADN : ADN permettent l'identification de groupes de souches dont la divergence à partir d'un ancêtre commun est récente. La technique d'hybridation ADN : ARN ribosomal 16s, permet de détecter des similitudes chez des micro-organismes plus éloignés. En effet, les cistrons impliqués dans la synthèse des ARN-r ont évolué moins rapidement que la plupart des autres gènes et possèdent des séquences de bases très conservées (De Smedt et De Ley, 1975). Les divergences entre ces séquences permettent de déterminer les relations phylogénétiques entre des espèces taxonomiquement plus distantes.

L'utilisation généralisée des hybridations ADN : ARN-r a conduit De Ley (1981) à distinguer cinq super-familles parmi les bactéries Gram négatives. La quatrième super-famille renferme de nombreux taxons qui jouent un rôle dans les relations bactéries-plantes, soit comme saprophytes, soit comme pathogènes ou symbiotes (tableau 2). Cette approche taxonomique apparente le genre *Bradyrhizobium* à la bactérie pourpre *Rhodopseudomonas palustris* (famille des Rhodospirillacées) et suggère que le genre *Bradyrhizobium* aurait pour ancêtre une bactérie photosynthétique du genre *Rhodopseudomonas* (Jarvis *et al.*, 1986). Le genre *Azorhizobium*, apparenté au genre *Xanthobacter*, constitue une branche séparée de la branche *Rhodopseudomonas palustris-Bradyrhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988).

Cette revue bibliographique montre la difficulté à définir un système de classification bactérienne dans lequel chaque genre ou espèce aurait une place bien définie. A l'intérieur d'un groupe taxonomique donné, il existe un continuum entre les diverses espèces qui peut difficilement être pris en compte. Cependant, la découverte de nouveaux rhizobia, la mise au





**Tableau 2:** Famille IV ARN-r. Dendrogramme simplifié des similarités entre les cistrons ARN-r basées sur les valeurs de Tm(e) des hybrides ADN: ARN-r homologues et hétérologues en utilisant des souches de référence. Ne sont pas représentés les genres: *Nitrobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas*, *Rhodobacter*, *Blastobacter*, etc. (d'après De Ley, 1981; Jarvis *et al.*, 1986; Dreyfus *et al.*, 1988; Green et Gillis, 1989).

point de nouvelles techniques, continueront de fournir des données qui permettront d'élargir, de modifier les positions taxonomiques des rhizobia ou d'en définir de nouvelles.

## 2. INFECTION ET DEVELOPPEMENT DES NODULES

L'établissement de la symbiose entre une légumineuse et son rhizobium spécifique, qui se manifeste par la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines de la plante hôte, est le résultat d'interactions complexes et coordonnées entre des processus bactériens et végétaux. Un nodule est formé après infection d'un tissu racinaire de la plante hôte selon un processus qui supprime les mécanismes naturels de défense de la plante.

La morphologie des nodules est caractéristique de la légumineuse considérée (Nutman, 1956), mais la présence du rhizobium est indispensable à l'induction de la morphogénèse. Si l'on ne connaît pas encore très bien tous les mécanismes qui aboutissent à la formation d'un nodule, il est clair, cependant, que la plante et la bactérie possèdent toutes deux une information génétique correspondante qui s'exprime lors de la symbiose.

Bien qu'il ne s'agisse pas d'une règle absolue, un fait remarquable est la présence de plasmides de haute masse moléculaire - > 500 Md - chez les bactéries du genre *Rhizobium* (Nuti *et al.*, 1977; Casse *et al.*, 1979). Ces mégaplasmines, appelés plasmides symbiotiques ou pSym, portent de nombreuses fonctions symbiotiques:

- les gènes nécessaires à la nodulation (région *nod* "commune" - *nod* ABC et *nod* D-) dont l'expression est contrôlée par des signaux sécrétés par la plante -les flavonoïdes- (Peters *et al.*, 1986; Long, 1989),
- les gènes de la spécificité d'hôte (*nod* EF, *nod* G et *nod* H)
- et les gènes de la fixation d'azote (*nif*).

Les Bradyrhizobia ne possèdent pas de plasmide pSym et les gènes symbiotiques sont portés par le chromosome.

En ce qui concerne le partenaire végétal, des protéines spécifiques appelées nodulines sont synthétisées lors de la symbiose (voir la revue de Verma *et al.*, 1986). Une classe importante de celles-ci est constituée par les lèghémoglobines.

Il existe deux modes principaux de pénétration des rhizobia dans les racines des légumineuses [voir les revues de Dart (1977) ou de Bauer (1981); Sprent et Faria, 1988]. Le premier fait intervenir les poils absorbants, à l'intérieur desquels se développent des cordons d'infection, et aboutit à la libération des rhizobia dans les cellules corticales de la plante hôte. Ce processus qui concerne la majorité des légumineuses tempérées est le plus étudié et le mieux connu. Le second, parfois appelé "crack entry", s'effectue par l'intermédiaire de cellules épidermiques et corticales rompues ou intactes, ou encore de tissus lésés au point d'émergence de racines latérales. C'est le mode dit infection intercellulaire directe. Rappelons brièvement les différents modes d'infection connus et leurs principales caractéristiques.

### 2. 1 Infection par l'intermédiaire des poils absorbants

Après prolifération dans la rhizosphère de la plante hôte, les rhizobia adhèrent à l'extrémité des poils absorbants. La reconnaissance spécifique qui s'exerce à ce niveau fait intervenir une série de signaux et de réponses, encore mal définis, échangés entre les deux partenaires. L'adhérence des rhizobia aux lectines du Trèfle (Dazzo et Hubell, 1975) constituerait, parmi d'autres, l'une de ces interactions.

L'entrée des rhizobia dans les poils absorbants est toujours précédée par une déformation caractéristique de l'extrémité de ces poils qui se recourbent en crosse. Cette déformation, induite par une ou plusieurs substances de nature inconnue produites par le



rhizobium, provoque la formation d'une poche renfermant le rhizobium. Très récemment, un signal chimique spécifique - NodRm-1 -, qui provoque la déformation des poils absorbants de la luzerne a été isolé de *Rhizobium meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990).

Les cordons d'infection, structures tubulaires contenant les rhizobia, prennent naissance à partir de ces poches et se développent progressivement vers la base du poil absorbant infecté puis vers l'intérieur de la racine (Turgeon et Bauer, 1982). Les cordons d'infection peuvent également être initiés dans le cas où le rhizobium se trouve enfermé dans une poche formée par les parois de deux poils à leur point de contact (Callaham et Torrey, 1981). Au site d'initiation du cordon, il y a dégradation de la paroi du poil. La paroi du cordon est formée par le dépôt de matériel fibrillaire nouvellement synthétisé. Avant que le cordon d'infection n'ait atteint la base du poil, une activité méristématique initiée à distance par le rhizobium, se développe dans les cellules corticales sous-jacentes (Truchet *et al.*, 1980). Lorsque le cordon a atteint la zone méristématique, il subit de nombreux branchements, de manière à ce qu'un très grand nombre de cellules puissent être infectées par le même cordon. La libération des rhizobia intervient alors par l'intermédiaire de vésicules formées à l'extrémité des cordons. Les rhizobia libérés sont entourés par une membrane pér bactéroïdienne formée à partir du cordon et de nature analogue à celle de la membrane plasmique.

## 2. 2 Autres modes d'infection des racines des légumineuses

Chez de nombreuses légumineuses, d'origine essentiellement tropicale ou sub-tropicale, les nodules ne présentent pas de cordon d'infection (Dart, 1977). C'est le cas d'*Arachis hypogaea* (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978), de plusieurs espèces d'*Aeschynomene* (Suessenguth et Beyerle, 1936; Arora, 1954; Yatazawa *et al.*, 1984) et de quelques espèces de *Stylosanthes* (Ranga Rao, 1977; Chandler *et al.*, 1982). Chez ces espèces, les rhizobia accèdent aux cellules corticales par l'intermédiaire de déchirures dans la couche épidermique telles que celles qui apparaissent au point d'émergence des racines latérales ou par le biais d'espaces intercellulaires situés à la jonction entre deux cellules épidermiques.

Ce mode d'infection particulier a été décrit dans ses grandes lignes chez l'Arachide par Chandler (1978). Chez *Arachis*, les poils absorbants sont présents uniquement au point d'émergence des racines latérales. Les rhizobia spécifiques sont, comme chez le Trèfle, capables d'induire la déformation et la courbure de ces poils. L'infection n'aura cependant lieu que si ces poils absorbants possèdent des cellules basales très élargies. La pénétration des rhizobia reste confinée aux espaces intercellulaires, créés entre la paroi du poil et les cellules corticales ou épidermiques voisines, au point d'émergence de la racine latérale. Les cellules basales du poil sont les premières à être envahies par les rhizobia après altération de leur paroi. Ces cellules envahies peuvent se diviser et seront incorporées ultérieurement dans le tissu central du nodule. Les rhizobia continuent leur progression en séparant les cellules corticales voisines au niveau de la lamelle moyenne et occupent les espaces intercellulaires ainsi formés. L'invasion des cellules corticales est suivie par une phase d'intense multiplication bactérienne, chaque rhizobium étant enfermé dans sa propre membrane de séquestration. Le nodule se développe ensuite par divisions successives des cellules hôtes infectées; chaque cellule fille contenant des rhizobia à l'état végétatif. Ce n'est que lorsque les cellules ne se divisent plus qu'a lieu la différenciation des rhizobia en bactéroïdes.

L'infection chez *Stylosanthes* diffère d'*Arachis* seulement par le fait que les premières cellules infectées dégénèrent. La progression des rhizobia dans le cortex profond est assurée par la dégénérescence successive des cellules infectées jusqu'à une zone du cortex où, au lieu de dégénérer, les cellules infectées se divisent activement et forment un méristème. Ensuite, le développement du nodule est analogue à celui décrit chez *Arachis* (Chandler *et al.*, 1982).

On distingue généralement deux types morphologiques de nodules. Les nodules ayant un méristème apical, une forme cylindrique ou allongée (*Medicago*, *Pisum*, *Trifolium*), ou en forme de collerette (*Lupinus*) sont du type indéterminé, tandis que les nodules de forme sphérique ou ovale, à vascularisation périphérique (*Arachis*, *Glycine max*, *Vigna*) sont du type déterminé (Goodchild, 1977). La morphologie des nodules est sous le contrôle du génome de la plante. Sen *et al.* (1986) ont montré qu'une même souche de rhizobium - 32H1 - pouvait induire la formation de nodules de type déterminé chez deux plantes hôtes différentes, cowpea et *Arachis*, dont le développement fait intervenir, dans le premier cas la formation de cordons d'infection, et dans le second, la division des cellules infectées.

Un autre mode d'infection, qui n'implique ni les poils absorbants, ni des déchirures de l'épiderme de la racine mais dans lequel les rhizobia pénètrent directement entre les cellules épidermiques intactes, a été récemment mis en évidence chez une légumineuse arborescente primitive, *Mimosa scabrella* (Faria *et al.*, 1988). Après avoir adhéré à la racine, les rhizobia pénètrent dans la couche mucilagineuse, puis dans la paroi cellulaire primaire des cellules épidermiques externes de la racine. Les bactéries ne pénètrent pas dans la paroi cellulaire secondaire interne. Elles s'infiltrant entre les cellules du cortex externe, en se déplaçant dans les parois cellulaires primaires et dans les espaces intercellulaires où elles s'y multiplient (Sprent et Faria, 1988). L'infection intracellulaire est parfois observée dans les cellules adjacentes. Elle paraît résulter de déformations ou invaginations de la paroi cellulaire de l'hôte, elles-mêmes dues à la prolifération des bactéries. La multiplication bactérienne se poursuit à l'intérieur de ces cellules, les rhizobia étant inclus en grand nombre dans de larges poches qui occupent une partie importante du volume de la cellule hôte. Des structures mal définies ressemblant à des cordons d'infection peuvent être émises à partir de ces poches, traverser la paroi cellulaire et infecter les cellules voisines. Il n'y a pas libération des rhizobia à partir de ces structures. Dans tous les cas, cette invasion conduit à la mort de la cellule hôte. L'initiation d'un méristème dans le cortex interne de la racine a lieu après l'invasion intracellulaire des cellules corticales externes. L'infection des cellules méristématiques par l'intermédiaire de cordons d'infection et le développement du nodule chez *Mimosa scabrella* seraient ensuite similaires à ceux décrits chez les légumineuses tempérées à nodules indéterminés (Newcomb, 1981).

## 2. 3 Processus d'infection chez les légumineuses à nodules caulinaires

La caractéristique commune des légumineuses à nodules caulinaires est la présence sur leur tige de sites de nodulation prédéterminés. Les nodules caulinaires se développent toujours au point d'émergence d'ébauches racinaires (Arora, 1954; Duhoux et Dreyfus, 1982). L'ontogénèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*, grâce aux travaux de Tsien *et al.* (1983) et de Duhoux (1984), est relativement bien connue.

Les sites de nodulation de *S. rostrata* sont constitués d'un dôme épidermique percé en son centre par l'apex de l'ébauche racinaire adventive. Le développement de ces ébauches racinaires crée, autour d'elles, une cavité circulaire entre leur cortex externe et l'épiderme de la tige de la plante. L'infection par les rhizobia a lieu au fond de cette cavité. Les rhizobia pénètrent dans les espaces intercellulaires; ils s'y multiplient activement, formant de volumineuses poches situées entre les couches externes du cortex de l'ébauche racinaire. Les poches possèdent une paroi propre et les bactéries qu'elles renferment sont incluses dans un matériel fibrillaire très lâche. A ce stade de l'infection, une activité méristématique est initiée dans les couches internes du cortex de l'ébauche racinaire. La différenciation d'un méristème nodulaire précède l'étape suivante qui est celle de l'apparition de cordons d'infection, formés à partir de digitations émises des poches intercellulaires. Ces cordons infectieux, d'abord intercellulaires

puis intracellulaires se ramifient, envahissent la zone méristématique et libèrent les rhizobia dans le cytoplasme des cellules.

En ce qui concerne les *Aeschynomene*, le processus d'infection conduisant à la formation des nodules caulinaires n'a, à ce jour, pas été décrit. Les études structurales et ultrastructurales des nodules de tige (Arora, 1954; Vaughn et Ellmore, 1985) et de racines d'*A. indica* (Arora, 1954; Yatazawa *et al.*, 1984) révèlent toutefois l'absence de cordons d'infection dans les nodules, laissant supposer que le processus d'infection serait, comme pour l'Arachide et *Stylosanthes*, du type intercellulaire ("crack entry").



## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

### 1. SOUCHES BACTERIENNES

#### 1. 1 Isolement des rhizobia contenus dans les nodules

Lorsque leur taille et leur morphologie le permettent, les nodules sont détachés manuellement de la tige ou de la racine. Dans le cas contraire, on découpe au scalpel la plus petite portion de la tige ou de la racine portant un nodule. Le matériel est immergé dans de l'alcool à 70 % pendant 5 minutes, puis dans une solution acidifiée de  $\text{HgCl}_2$  à 0,01 % pendant 5 minutes avant d'être rincé abondamment à l'eau distillée stérile. L'isolement du rhizobium peut être pratiqué, soit directement en piquant avec d'un fil de platine à l'intérieur d'un nodule sectionné en deux portions, soit, lorsque le nodule est de petite taille, après broyage du nodule dans une goutte d'eau stérile à l'aide d'un broyeur homogénéiseur de Potter. Le prélèvement réalisé est étalé sur un milieu gélosé approprié.

#### 1. 2 Souches isolées de nodules de tiges et de racines d'Aeschynomènes

Les souches de rhizobia d'Aeschynomènes utilisées dans ce travail sont présentées sur le tableau 3. Les souches sont conservées soit à 4 °C en gélose inclinée, soit à l'état lyophilisé ou encore à -20 °C en milieu YM additionné de 50 % de glycérol.

#### 1. 3 Souches bactériennes de référence et autres souches utilisées en taxonomie

Les souches de référence et les souches utilisées pour l'étude taxonomique sont présentées sur le tableau 4.

### 2. PLANTES

Les différentes espèces d'*Aeschynomene* étudiées sont les suivantes:

- Aeschynomènes rencontrées au Sénégal: *A. afraspera*, *A. americana*, *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. indica*, *A. pfundii*, *A. schimperi*, *A. sensitiva*, *A. tambacoundensis* et *A. uniflora*. Il faut noter que l'espèce *A. indica* semble posséder deux autres sous-espèces qui se différencient de la première par la taille et le port des plantes ainsi que par la forme et les dimensions des gousses et des graines.
- Aeschynomènes provenant de la collection de l'IFAS, Université de Floride: *A. ciliata*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. falcata*, *A. fluminensis*, *A. histrix*, *A. nilotica*, *A. pratensis*, *A. rudis*, *A. scabra* et *A. villosa*.
- autres plantes utilisées: *Arachis hypogaea*, *Macroptilium atropurpureum* (Siratro), *Sesbania rostrata*, *Stylosanthes guyanensis*, et *Vigna unguiculata* (Niébé, cowpea).

Souches	Plantes hôte d'isolement	Origine ou référence
ORS301	<i>A. americana</i>	Rive du Niger, Bamako (Mali)
ORS302	<i>A. pfundii</i> (T*)	Lac de Guiers (Sénégal)
ORS303	<i>A. afraspera</i> (T)	Mare d'Oursi (Niger)
ORS304	<i>A. elaphroxylon</i> (T*)	Lac de Guiers (Sénégal)
ORS305	<i>A. schimperi</i> (R)	Koulhar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS306	<i>A. indica</i> (T)	Lac de Guiers (Sénégal)
ORS308	<i>A. afraspera</i> (R)	Balandine, Casamance (Sén.)
ORS309	<i>A. uniflora</i> (T)	Tananarive (Madagascar)
ORS310	<i>A. indica</i> (T)	Keur Mactar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS312	<i>A. afraspera</i> (R)	Salémata, Sénégal Oriental
ORS314	<i>A. nilotica</i> (T)	Bel-Air, Dakar (Sén.)
ORS315	<i>A. afraspera</i> (T)	Keur Mactar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS316	<i>A. afraspera</i> (T)	Anambé, Vélingara (Sén.)
ORS318	<i>A. indica</i> subsp1 (T)	M'Bidi, Ferlo (Sén.)
ORS319	<i>A. indica</i> subsp1 (T)	Richard-Toll, Fleuve (Sén.)
ORS320	<i>A. indica</i> (T)	Fatick, Sine-Saloum (Sén.)
ORS322	<i>A. afraspera</i> (T)	Keur Mactar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS324	<i>A. afraspera</i> (R)	Keur Mactar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS326	<i>A. afraspera</i> (T)	Bel-Air, Dakar (Sén.)
ORS328	<i>A. indica</i> subsp2 (T)	Keur Momar Sarr, Fleuve (Sén.)
ORS329	<i>A. elaphroxylon</i> (T*)	Lac de Guiers (Sén.)
ORS330	<i>A. sensitiva</i> (T)	Djibélor, Casamance (Sén.)
ORS331	<i>A. tambacoundensis</i> (T)	Tambacounda (Sén.)
ORS334	<i>A. tambacoundensis</i> (T)	Tambacounda (Sén.)
ORS336	<i>A. afraspera</i> (T)	Anambé, Vélingara (Sén.)
ORS337	<i>A. afraspera</i> (R)	Bel-Air, Dakar (Sén.)
ORS338	<i>A. indica</i> (T)	Fissel (Sén.)
ORS343	<i>A. schimperi</i> (T)	Koulhar, Sine-Saloum (Sén.)
ORS347	<i>A. afraspera</i> (T)	Tobor, Casamance (Sén.)
ORS351	<i>A. afraspera</i> (T)	Néma, Sine-Saloum (Sén.)
ORS355	<i>A. uniflora</i> (T)	Hauts-Plateaux (Madagascar)
ORS362	<i>A. afraspera</i> (T)	Fiméla, Sine-Saloum (Sén.)
ORS364	<i>A. nilotica</i> (T)	Bel-Air, Dakar (Sén.)
ORS370	<i>Aeschynomene</i> sp.	Burundi

T, souche isolée de nodule de tige

R, souche isolée de nodule de racine

\*, nodules caulinares localisés sur la partie basse et immergée de la tige

**Tableau 3:** Caractéristiques des souches de rhizobia d'*Aeschynomene*.

Tableau 4: Souches bactériennes utilisées pour la taxonomie.

Souches	Plante hôte d'isolement	Origine ou référence
<b><i>Azorhizobium</i></b>		
ORS571	<i>Sesbania rostrata</i> (T)	Ferlo (Sénégal), B. Dreyfus
ORS56	<i>S. rostrata</i> (T)	Ferlo, B. Dreyfus
M1	<i>S. rostrata</i> (T)	Madagascar, R. Fetiaron
M2	<i>S. rostrata</i> (T)	Madagascar, R. Fetiaron
ORS780	<i>S. rostrata</i> (T)	Casamance (Sén.), I. N'Doye
ORS781	<i>S. rostrata</i> (T)	Casamance, I. N'Doye
<b><i>Rhizobium</i></b>		
ORS22	<i>S. rostrata</i> (R)	B. Dreyfus
ORS51	<i>S. rostrata</i> (R)	B. Dreyfus
ORS57	<i>S. rostrata</i> (R)	B. Dreyfus
ORS502	<i>S. rostrata</i> (R)	B. Dreyfus
ORS609	<i>Sesbania cannabina</i> (R)	I. N'Doye
ORS611	<i>Sesbania grandiflora</i> (R)	B. Dreyfus
ORS616	<i>S. grandiflora</i> (R)	B. Dreyfus
ORS911	<i>A. farnesiana</i>	B. Dreyfus
ORS1001	<i>Acacia senegal</i>	S. Badji
ORS1002	<i>A. senegal</i>	S. Badji
ORS1004	<i>A. senegal</i>	S. Badji
ORS1007	<i>A. senegal</i>	S. Badji
ORS1009	<i>A. senegal</i>	S. Badji
Nept	<i>Neptunia oleracea</i>	B. Dreyfus
L5-30	<i>Medicago sativa</i>	INRA-CNRS Toulouse
2011	<i>M. sativa</i>	INRA-CNRS Toulouse
102F34	<i>M. sativa</i>	INRA-CNRS Toulouse
ANU843	<i>Trifolium repens</i>	INRA-CNRS Toulouse
TAL620	<i>Cicer arietinum</i>	NifTAL, Hawaii
NGR234	<i>Lablab purpureus</i>	CSIRO, Canberra (Australie)
IC3100	<i>Cajanus cajan</i>	ICRISAT, Hyderabad (Inde)
USDA191	<i>Glycine max. (Sinorhizobium fredii)</i>	USDA-ARS, Beltsville (USA)
USDA205	<i>Glycine max. (R. fredii)</i>	USDA-ARS, Beltsville
TAL82	<i>Leucaena leucocephala</i>	NifTAL, Hawaii
TAL1145	<i>L. leucocephala</i>	NifTAL, Hawaii
TAL1399	<i>Vicia faba</i>	NifTAL, Hawaii
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>		
ORS103	<i>Acacia albida</i>	B. Dreyfus
ORS841	<i>Acacia holosericea</i>	F. Cornet
		.../...

Tableau 4 (suite)

Souches	Plante hôte d'isolement	Origine ou référence
ORS800	<i>Acacia mangium</i>	S. N'Diaye
ORS802	<i>A. mangium</i>	S. N'Diaye
Al6	<i>Albizia lebbek</i>	O. Diagne
Gs16	<i>Glyricidia sepium</i>	O. Diagne
TAL1127	<i>Cajanus cajan</i>	NifTAL, Hawaii
TAL1132	<i>C. cajan</i>	NifTAL, Hawaii
CB756	<i>Macrotyloma africanum</i>	USDA-ARS, Beltsville
TAL102	<i>Glycine max.</i>	USDA-ARS, Beltsville
TAL377	<i>G. max</i>	USDA-ARS, Beltsville
USDA136	<i>G. max</i>	USDA-ARS, Beltsville
Nig2	<i>G. max</i>	IITA, Ibadan (Nigéria)
RCH	<i>Arachis hypogaea</i>	S. N'Diaye
TAL1000	<i>A. hypogaea</i>	NifTAL, Hawaii
TAL1371	<i>A. hypogaea</i>	NifTAL, Hawaii
32H1	<i>Phaseolus aureus</i>	USDA-ARS, Beltsville
ORS407	<i>Vigna unguiculata</i>	B. Dreyfus
TAL169	<i>V. unguiculata</i>	NifTAL, Hawaii
TAL209	<i>V. radiata</i>	NifTAL, Hawaii
TAL1021	<i>Phsophocarpus tetragonolobus</i>	NifTAL, Hawaii
<b><i>Agrobacterium</i></b>		
A4pc	( <i>Agrobacterium rhizogenes</i> )	LMG, Gand (Belgique)
<b><i>Phyllobacterium</i></b>		
LMG1t1	( <i>Phyllobacterium rubiacearum</i> )	LMG, Gand
LMG1t2	( <i>P. myriacinacearum</i> )	LMG, Gand
<b><i>Xanthobacter</i></b>		
LMG7043	( <i>Xanthobacter autotrophicus</i> )	LMG, Gand
LMG7044	( <i>X. autotrophicus</i> )	LMG, Gand



### 3. MILIEUX DE CULTURE

#### 3. 1 Milieux de culture des rhizobia

##### 3.1.1 Milieu YM

La composition du milieu YM (Vincent, 1970) pour l'isolement et la culture des rhizobia est la suivante (pour 1 litre): mannitol, 10 g;  $K_2HPO_4$ , 0,5 g;  $MgSO_4 (7H_2O)$ , 0,1 g;  $CaCl_2 (2H_2O)$ , 40 mg;  $FeCl_3 (6H_2O)$ , 4 mg; extrait de levure, 1 g. Le pH est ajusté à 6,8 avant stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes. Le milieu YMA est le milieu YM additionné de 20 g d'agar.

##### 3.1. 2 Milieu minimal pour la fixation d'azote *in vitro* (SA)

Le milieu minimal (SA) contient (pour 1 litre): D-arabinose, 6 g; succinate de sodium, 5,4 g;  $K_2HPO_4$ , 1,6 g;  $KH_2PO_4$ , 0,8 g;  $MgSO_4 (7H_2O)$ , 0,1 g;  $CaCl_2 (2H_2O)$ , 40 mg;  $FeCl_3 (6H_2O)$ , 10 mg; NaCl, 50 mg;  $Na_2MoO_4 (2H_2O)$ , 10 mg;  $MnSO_4 (7H_2O)$ , 2 mg;  $ZnSO_4 (7H_2O)$ , 0,22 mg;  $CuSO_4 (5H_2O)$ , 0,08 mg;  $H_3BO_3$ , 3 mg; biotine, 0,6 mg; acide pantothénique, 1,25 mg; acide nicotinique, 1,25 mg. Le pH est ajusté à 6,8.

Le milieu SA gélosé contient 8 g d'agar Noble (Difco) par litre.

##### 3.1. 3 Milieu SAG

C'est le milieu SA supplémenté par 0,5 g de glutamate de sodium.

#### 3. 2 Milieux de culture pour les plantes

##### 3.2.1 Milieu de Jensen

Le milieu de Jensen (Vincent, 1970) pour la culture des plantes en tubes contient (pour 1 litre):  $K_2HPO_4$ , 0,2 g;  $MgSO_4 (7H_2O)$ , 0,2 g; NaCl, 0,2 g;  $CaPO_4$ , 1 g;  $FeCl_3 (6H_2O)$ , 0,14 g;  $H_3BO_3$ , 2,86 mg;  $MnSO_4 (4H_2O)$ , 2,03 mg;  $ZnSO_4 (7H_2O)$ , 0,22 mg;  $CuSO_4 (5H_2O)$ , 0,08 mg;  $Na_2MoO_4 (H_2O)$ , 0,09 mg. Le pH est ajusté à 6,7 avant stérilisation à 110 °C pendant 30 minutes.

##### 3. 2. 2 Milieu de culture des plantes en présence d'azote combiné

Le milieu de culture des plantes (Hewitt, 1966) pour l'étude de l'effet de l'azote combiné en cultures hydroponiques a la composition suivante (pour 1 litre):  $K_2HPO_4$ , 108,8 mg;  $CaCl_2 (2H_2O)$ , 117,8 mg;  $MgSO_4 (7H_2O)$ , 77,2 mg;  $MnSO_4 (4H_2O)$ , 0,45 mg;  $CuSO_4 (5H_2O)$ , 0,05 mg;  $ZnSO_4 (7H_2O)$ , 0,058 mg;  $H_3BO_3$ , 0,62 mg; NaCl, 1,2 mg;  $Na_2MoO_4 (2H_2O)$ , 0,025 mg; NaFe-EDTA, 10 mg. le pH de la solution est ajusté à 6,5 avant stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes.

### 4. METHODES DE CULTURE DES RHIZOBIA

#### 4. 1 Culture asymbiotique en milieu faiblement gélosé

La fixation d'azote *in vitro* a été estimée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène des souches de rhizobia cultivées en milieu SA(G) faiblement gélosé selon une technique analogue à celle décrite par Döbereiner et Day (1976). Les rhizobia, environ  $5 \times 10^8$  bactéries contenues dans 1 ml de milieu SA et provenant d'une culture âgée de 4 jours (D.O. à 570 nm = 1) en milieu YM préalablement centrifugée et lavée avec du milieu SA, sont mis en culture dans

des tubes à essais de 180 x 18 mm contenant 4 ml de milieu gélosé maintenu à 50 °C. Après l'inoculation, une bourre de coton cardé stérile est introduite à mi-hauteur dans chaque tube à essai, de manière à assurer l'asepsie dans la partie inférieure du tube, puis les tubes sont fermés avec des bouchons à jupe rabattable. On injecte de l'acétylène dans la phase gazeuse à la concentration finale de 5 % et les tubes sont placés à l'étuve à 30 °C. Des échantillons de la phase gazeuse sont prélevés chaque jour et l'éthylène produit est mesuré par chromatographie en phase gazeuse (paragraphe 6.1).

## 4. 2 Culture asymbiotique en milieu liquide

Les expériences en milieu liquide sont réalisées dans des flacons serum de 570 ml contenant 15 ml de milieu SA(G). Après inoculation par des rhizobia conditionnés comme ci-dessus, les flacons sont placés sur un agitateur rotatif (150 rpm).

## 5. METHODES DE CULTURE ET INOCULATION DES PLANTES

### 5. 1 Stérilisation et germination des graines

Les graines des différentes Aeschynomènes et celles de *Sesbania rostrata* sont stérilisées extérieurement et leur cuticule attendrie par un bain de 20 minutes dans de l'acide sulfurique concentré (5 minutes pour *A. falcata* et *A. histrix*, 15 minutes pour *A. americana*). Lorsque la stérilisation des graines n'est pas nécessaire, par exemple lors d'une expérimentation au champ, l'inhibition tégumentaire est levée en scarifiant les graines entre deux papiers de verre. Les graines d'*Arachis hypogaea*, de *Macroptilium atropurpureum*, de *Stylosanthes guyanensis* et de *Vigna unguiculata* sont désinfectées par trempage pendant 3 minutes dans une solution acidifiée de HgCl<sub>2</sub> à 0,1 % (Vincent, 1970). Après 5 rinçages successifs avec de l'eau stérile, elles sont laissées 4 heures dans l'eau du dernier rinçage puis réparties stérilement sur la surface de boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 10 g/l. Les boîtes sont ensuite incubées en atmosphère humide à 30 °C et à l'obscurité jusqu'à ce que les racines apparues aient atteint une taille de 1 cm.

### 5. 2 Cultures hydroponiques

#### 5.2.1 Tubes de Gibson

Après germination, les plantules sont transférées dans les dispositifs de culture décrits par Gibson (1963). Ce sont des tubes à essais de 15x150 mm, remplis d'eau et contenant 10 ml de milieu de Jensen (paragraphe 3.2.1) en pente gélosée. Ils sont recouverts à leur extrémité par du papier aluminium comportant un orifice par lequel on introduit la racine de la plantule. Un autre orifice pratiqué dans le capuchon d'aluminium permet le remplissage et le maintien du niveau d'eau dans les tubes. Les plantules sont d'abord placées en atmosphère humide pendant 48 h pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonaire des semis, puis dans une étuve à température et éclairage contrôlés. A une période de 14 h à 10 000 lux avec une température régulée à 30 °C, succède une période d'obscurité de 10 h avec une température de 25 °C.

#### 5.2.2 Culture des plantes en présence d'azote combiné

Les tubes de culture sont des tubes de Gibson de 30 x 200 mm contenant 125 ml de milieu de Hewitt (paragraphe 3.2.2). Les tubes comportent à leur partie inférieure un orifice obturé par un bouchon Vacutainer qui facilite la vidange des tubes lors du renouvellement du milieu de culture. Pour permettre un meilleur développement des plantes, le milieu de Hewitt

est additionné de 0,5 mM d'azote sous la forme de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  pendant les 3 premières semaines de culture des plantes. Le milieu de culture est renouvelé chaque semaine jusqu'à l'inoculation des plantes.

#### 5.2.2.1 Effet du nitrate sur l'activité nitrogénase des nodules préexistants

Pour étudier l'effet du nitrate sous la forme de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sur l'activité des nodules déjà formés sur les tiges et les racines d'*A. afraspera*, 5 concentrations en nitrate (0, 3, 6, 9 et 12 mM  $\text{NO}_3$ ) ont été appliquées sur des plantes âgées de 44 jours. Ces plantes ont préalablement été inoculées après 30 jours de culture. Après l'application du nitrate, le changement du milieu nutritif des plantes est effectué tous les jours jusqu'au moment de la récolte, le 50<sup>ème</sup> jour de culture.

#### 5.2.2.2 Effet du nitrate sur la formation et l'activité nitrogénase des nodules

Les plantes sont cultivées pendant 22 jours en tubes de Gibson avant de recevoir le traitement en nitrate (0, 3, 6, 9, 12 et 15 mM  $\text{NO}_3$ ). Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2 jours. L'inoculation des tiges et des racines a lieu le 30<sup>ème</sup> jour de culture, et la récolte des plantes 20 jours plus tard.

### 5. 3 Culture des plantes dans les conditions du champ

#### 5.3.1 Cultures sur sol en vase de végétation ou en microparcelles.

Les plantes sont cultivées dans des vases de végétation constitués par des cylindres en P.V.C. de 30 cm de diamètre et de 60 cm de profondeur, hermétiquement fermés à leur partie inférieure et enterrés dans le sol jusqu'à 10 cm de leur bord supérieur. Ils sont remplis avec 30 kg de sol sableux (station de Bel-Air) dont la teneur en azote est d'environ 0,03 % (tableau 5). Les cultures des plantes en pots sur un sol très pauvre en éléments minéraux ont été réalisées avec un sol provenant d'une dune côtière (sol de Cambérène, tableau 5).

#### 5.3.2 Cultures en présence d'azote combiné.

L'effet de l'azote combiné, sous la forme d'urée, sur la croissance et la fixation de l'azote par *A. afraspera* cultivée au champ a été suivi après l'application de 4 traitements azotés correspondant à 0, 50, 100, 200 kg N-urée par ha. L'expérimentation a été réalisée dans des vases de végétation contenant chacun 30 kg de sol de Bel-Air complémenté par 1,34 g de KCl, 2,64 g de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  et 1,74 g de  $\text{MgSO}_4$  représentant respectivement 100, 100 et 50 kg de K, P et Mg par ha. L'apport d'engrais azoté a été fractionné, 50% au moment du semis et 50% le 30<sup>ème</sup> jour de culture (0, 0,38, 0,76 et 1,55 g d'urée par apport). Les racines et les tiges des plantes ont été inoculées respectivement le 20<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour de culture.

#### 5.3.3 Effet du phosphore et du potassium sur la croissance et la fixation d'azote par *A. afraspera*.

Les plantes ont été cultivées dans des pots contenant chacun 3,5 kg de sol de Cambérène (tableau 5). L'application de KCl avec 3 répétitions par traitement a été effectuée à 3 concentrations (0, 100, et 200 mg K / kg de sol) en présence ou non de 100 mg P / kg de sol.

	Sol de Bel-Air	Sol de Cambérène
Argile	3,8 %	-
Limon fin	1,4 %	-
Limon grossier	0,7 %	-
Sable fin	48,4 %	98,4 %
Sable grossier	44,5 %	
pH(eau)	7,7	-
pH(KCl)	7,0	6,2
Carbone	0,4 %	-
Azote	0,026 %	0,010 %
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total	0,035 %	0,010 %
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> assimilable	0,028 %	-

**Tableau 5:** Caractéristiques physico-chimiques des sols de Bel-Air et de Cambérène

L'inoculation des plantes (1 plante / pot) a eu lieu au moment du semis (racines) et le 30<sup>ème</sup> jour de culture (tiges). Les plantes ont été récoltées 50 jours après le semis.

#### 5. 4 Culture du riz en microparcelles - Effet de l'engrais vert.

Le riz est cultivé dans des microparcelles de 1 m<sup>2</sup> faisant partie d'un dispositif de 20 cases lysimétriques en béton. Chacune des cases de 1 m de profondeur contient 500 kg de sol sableux de Bel-Air. Quatre traitements avec 5 répétitions ont été appliqués dans un dispositif au hasard:

(a) Engrais vert *A. afraspera*. Après stérilisation et germination comme décrit précédemment, les graines sont semées dans les microparcelles à la densité de 60 graines par m<sup>2</sup>. Les microparcelles sont fertilisées avec un engrais PK constitué par 16,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 9,1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> par parcelle, correspondant à 50 kg P et 100 kg K par ha. L'inoculation des racines a lieu le jour du semis (10<sup>8</sup> bactéries par graine). Le sol est maintenu humide jusqu'à ce que les plantules aient 3 à 5 cm de hauteur, puis submergé sous une fine lame d'eau. Les tiges des plantes sont inoculées 3 semaines après la germination, par vaporisation d'une suspension bactérienne diluée de la souche ORS322 (10<sup>8</sup> bactéries/ml). La récolte a lieu lorsque les plantes sont âgées de 7 semaines. Après drainage du sol, les plantes sont coupées, pesées puis débitées en fragments de 10 à 20 cm de long avant d'être enfouies dans le sol. Des plantules de riz de la variété Moroberekan âgées de deux semaines sont repiquées 2 semaines après l'enfouissement, à la densité de 25 poquets de 3 plantules par m<sup>2</sup>.

(b) Engrais vert *A. nilotica*. Même traitement qu'en (a).

(c) Engrais azoté. Pendant les 9 semaines qui précèdent le repiquage du riz, les microparcelles sont laissées en jachère nue avec le même traitement hydrique qu'en (a) et (b). Ensuite, les parcelles reçoivent l'engrais PK, sont repiquées en riz puis irriguées. L'engrais azoté (22.2 g d'urée par parcelle) correspondant à 100 kg de N par ha, est apporté en deux fois, une moitié avant le repiquage du riz, l'autre moitié au moment du tallage du riz.

(d) Parcelles témoins. Traitement identique qu'en (c), mais les parcelles reçoivent seulement l'engrais PK avant le repiquage du riz.

Le riz est récolté 140 jours après le repiquage.

#### 5. 5 Inoculation des plantes

Les plantes cultivées en tubes de Gibson sont, en général, inoculées après 48 h de culture. Les tubes sont inoculés, à l'aide d'une seringue ou d'une pipette stérile, avec environ 2x10<sup>8</sup> bactéries provenant d'une culture de rhizobium spécifique en phase stationnaire de croissance en milieu YM, préalablement centrifugée et lavée à l'eau distillée. L'inoculation des tiges est réalisée en badigeonnant les sites de nodulation avec un pinceau fin, trempé auparavant dans une culture bactérienne diluée au 1/10<sup>o</sup>.

Lorsque les plantes sont cultivées en vases de végétation ou en microparcelles, l'inoculation des racines est obtenue en arrosant les plantes avec une suspension diluée d'une culture du rhizobium spécifique, tandis que l'inoculation des tiges est assurée par pulvérisation de la culture bactérienne diluée.

## 6. METHODES DE DOSAGE

### 6. 1 Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA)

L'activité de la nitrogénase est mesurée par la réduction de l'acétylène en éthylène (Hardy *et al.*, 1968). A une pression partielle égale ou supérieure à 10 %, l'acétylène inhibe les autres substrats que la nitrogénase est capable de réduire. Cette propriété est utilisée pour évaluer l'activité nitrogénase par le dosage de l'éthylène produit.

Des échantillons gazeux de 0,5 ml sont prélevés et la quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. On utilise un chromatographe Varian Aerograph à ionisation de flamme, modèle 1400, équipé d'une colonne en acier inoxydable de 1,20 m x 0,2 mm remplie de Sphérosil XOB 075. La température de la colonne est de 75 °C, celle de l'injecteur est de 60 °C et celle du détecteur de 150 °C. Le gaz vecteur est l'azote dont le débit est de 40 ml/min. La quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à un échantillon de référence contenant de l'éthylène à 1 pour 1000.

La mesure de l'activité réductrice d'acétylène des nodules de tige et de racines est effectuée après avoir introduit les tiges ou les systèmes racinaires des plantes dans des flacons sérum de 250 ou 570 ml. Les flacons sont bouchés hermétiquement avec des capuchons en caoutchouc et l'acétylène est injectée à la concentration finale de 10 %. L'éthylène produit est mesuré après 30 minutes et 1 h d'incubation à 30 °C. L'ARA totale est exprimée en  $\mu$ moles de  $C_2H_4$  produites par h et par plante. L'ARA spécifique est exprimée en  $\mu$ moles de  $C_2H_4$  produites par h et par g de nodules (poids frais ou poids sec).

### 6. 2 Dosage de l'azote total

Les échantillons végétaux sont préalablement mis à sécher dans une étuve à 70 °C pendant 48 h, puis finement broyés à l'aide d'un broyeur à marteaux. Le dosage de l'azote total selon le procédé de Kjeldahl (Bremner, 1960) est effectué par un analyseur semi-automatique Büchi après minéralisation à chaud par l'acide sulfurique concentré.

### 6. 3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines bactériennes est effectué, après mise en solution des protéines par chauffage en milieu alcalin, selon la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951) en utilisant de l'albumine de boeuf comme référence.

### 6. 4 Analyses de l'essai engrais vert

La matière verte enfouie est préalablement pesée, le poids sec déterminé par séchage à l'étuve à 105 °C pendant 24 h et la teneur en N total selon le procédé de Kjeldahl (Bremner, 1960) en utilisant un analyseur semi-automatique Büchi.

Au moment de la récolte, les plants de riz sont coupés au niveau du collet et les panicules sont comptées. Les grains et les pailles sont pesés séparément et leur teneur respective en azote déterminée selon la méthode de Kjeldahl.

Cinq échantillons végétaux sont prélevés dans chaque parcelle et chaque mesure est la moyenne de 3 répétitions.

## 7. HISTOLOGIE

### 7. 1 Microscopie électronique

Les nodules de tige régulièrement prélevés au cours de leur développement ont été fixés pendant 1 h sous vide et à température ambiante dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M (pH 7,2). Le matériel est ensuite lavé 4 fois dans le même tampon puis post-fixé pendant 1 h dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % dans du tampon cacodylate 0,2 M. Après fixation, les nodules sont inclus dans l'Epon 812. Les coupes ultrafines sont observées au microscope électronique Siemens Elmiskop 101 ou JEOL 1200EX après contraste par l'acétate d'uranyle à 2 % et le citrate de plomb (Reynolds, 1963).

### 7. 2 Microscopie photonique

La fixation pour l'observation en microscopie photonique a été réalisée, soit dans le mélange alcool-formol-acide acétique (Lison, 1960), soit dans la solution de glutaraldéhyde à 2 % décrite ci-dessus. Après déshydratation à l'alcool, le matériel est inclus dans le Paraplast (+) (Brunswick Laboratory) ou l'Epon 812. Les coupes sont observées après coloration par le bleu de toluidine à 0,1 % ou par l'hématoxyline ferrique de Regaud (Lison, 1960).

### 7. 3 Observation du nucléoïde des bactéroïdes

De manière à obtenir une meilleure fixation du nucléoïde bactérien, nous avons utilisé la méthode de Ryter et Kellenberger (1958). Des fragments de nodosités matures ont été fixés pendant une nuit dans le tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon de Michaelis, puis pendant 2 h dans un mélange d'acétate d'uranyle à 0,5 % dans le tampon de Michaelis à pH 6,1. Après déshydratation, le matériel est inclus dans l'Epon.

Extraction par la pronase et la DNase: Sur des coupes ultrafines, des extractions d'une durée de 20 min. à 2 h, ont été réalisées par la pronase à 0,01 % dans de l'eau distillée et/ou par de la DNase à 0,1 % dans une solution aqueuse de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  à 0,003 M. Les coupes ont ensuite été contrastées rapidement par l'acétate d'uranyle et par le citrate de plomb.

Coloration régressive à l'EDTA: Des coupes de matériel fixé par la glutaraldéhyde à 2,5 % puis incluses dans l'Epon ont été traitées selon la technique de Benhard (1969). Les grilles contenant les coupes ont été mises à flotter pendant 1 min. sur une solution aqueuse d'EDTA à 0,2 M, puis 1 min. sur une solution aqueuse de citrate de plomb avant d'être observées en microscopie électronique.

## 8. ETUDE TAXONOMIQUE DES RHIZOBIA ISOLÉS D'*AESCHYNOMENE*

### 8. 1 Taxonomie numérique

Cette étude est basée sur l'examen de 148 caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

#### 8.1.1 Caractères morphologiques

L'aspect des colonies (diamètre, surface, contour, consistance, coloration) a été déterminé sur des cultures de 5 jours en milieu YM gélosé. Les flagelles ont été mis en évidence par la technique de Rhodes (1958) sur de jeunes cultures en milieu YM gélosé.

### 8.1.2 Caractères physiologiques

Ont été testées sur le milieu YM gélosé, la vitesse de croissance, la croissance à 42 °C et à différents pH (4,5; 9), la production d'acide ou d'alcali en présence de bleu de bromothymol (25 mg/l) ainsi que la tolérance à des concentrations élevées en NaCl (1%) et en KNO<sub>3</sub> (8%).

L'aptitude à fixer l'azote en culture a été déterminée sur des cultures en tubes à hémolyse munis d'un bouchon Vacutainer contenant 2 ml de milieu SA faiblement gélosé (0,3 %). Après inoculation, on introduit 1 % d'acétylène dans la phase gazeuse et les cultures sont placées à l'étuve à 30 °C. Après 3 et 10 jours d'incubation sous acétylène, la recherche de l'éthylène produit est effectuée par chromatographie en phase gazeuse.

La prototrophie vis-à-vis du mannitol a été testée sur le milieu YM dans lequel l'extrait de levure a été remplacé par 0,25 g/l de NH<sub>4</sub>Cl.

### 8.1.3 Caractères biochimiques

Les tests suivants ont été réalisés selon les procédés décrits par Smibert et Krieg (1981): recherche de la  $\beta$ -galactosidase, de la 3-kétolactose à partir de l'oxydation du lactose, de l'uréase, croissance sur le milieu au citrate de Simmons. La réduction du nitrate en nitrite a été recherchée sur le milieu YM additionné de 0,5 g/l de KNO<sub>3</sub>, à l'aide du réactif de Griess-Ilosvay; la poudre de zinc a été utilisée pour détecter la réduction du nitrate en gaz.

### 8.1.4 Etude nutritionnelle

Le milieu minéral de base contient: NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,27 g; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0,1 g; NaCl, 20 mg; FeCl<sub>3</sub>, 40 mg; CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O), 40 mg; CuSO<sub>4</sub> (5H<sub>2</sub>O), 80 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,8 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O), 90 mg; MnSO<sub>4</sub> (4H<sub>2</sub>O), 2,03 mg; ZnSO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O), 0,2 mg; biotine, 1 mg; acide nicotinique, 10 mg; acide pantothénique, 2 mg; thiamine-HCl, 2 mg; pyridoxal-HCl, 2 mg; agar Noble (Difco), 15 g; eau distillée, q.s.p. 1 litre. Les vitamines et la source de carbone ont été ajoutées au milieu préalablement stérilisé, après filtration sur filtre Millipore 0,45  $\mu$ m. 94 substrats organiques ont été testés comme unique source de carbone et d'énergie à raison de 2 g/l pour les glucides et de 1 g/l pour les autres composés.

L'ensemencement des boîtes de Pétri a été réalisé, au moyen d'un inoculateur multipoint Denley A400, avec des suspensions dans de l'eau distillée réalisées à partir de jeunes cultures prélevées sur des milieux gélosés YM. Après 5 et 10 jours d'incubation à 30 °C, la présence ou l'absence de croissance a été déterminée par rapport à un témoin sans substrat carboné. Les croissances dues à des mutations ont été écartées.

Pour permettre leur exploitation au moyen d'un programme de calcul automatique, nous avons utilisé un langage binaire où les caractères ont été codés "2" pour positifs et "1" pour négatifs. Pour les tests tels que l'aspect des colonies où plusieurs réponses sont possibles pour un même caractère, les réponses négatives sont codées "0".

Les données ont été traitées en utilisant le coefficient de similitude de Sokal et Michener (1958). L'analyse numérique a été effectuée par un ordinateur Siemens avec un programme de calcul Clustan 3 de G. F. Bonham-Carter disponible au laboratoire de microbiologie et de génétique microbienne (LMG) du professeur Kersters à l'université de Gand (Belgique).

## 8. 2 Taxonomie moléculaire

Ces travaux ont été réalisés au LMG de l'université de Gand par le groupe de M. Gillis en utilisant les techniques mises au point dans ce laboratoire.



### 8.2.1 Détermination du G + C %

L'ADN a été extrait de cultures cellulaires selon la méthode de Marmur (1961). La composition en bases (G+C %) a été mesurée par la méthode de dénaturation thermique (De Ley et Van Muylem, 1963) en utilisant l'équation de Marmur et Doty (1962) modifiée par De Ley (1970).

### 8.2.2 Hybridation ADN:ARN ribosomal 16s

L'extraction et la fixation de l'ADN monocaténaire sur des membranes filtrantes Sartorius SM11358 ont été effectués selon les procédés décrits par Gillis et De Ley (1980).

La préparation des ARNr marqués, au  $^{14}\text{C}$  pour la souche *B. japonicum* NZP5549<sup>T</sup> (T pour souche type) et au  $^3\text{H}$  pour la souche de *R. meliloti* NZP4009 et celle d'*A. caulinodans* ORS571<sup>T</sup>, a été réalisée selon la technique de Van Landschoot et De Ley (1981).

Les hybridations ADN:ARNr ont été effectuées d'après les méthodes décrites par De Smedt et De Ley (1977), De Vos *et al.* (1985) et Jarvis *et al.* (1986). Les paramètres mesurés sont les suivants: (a)  $T_m(e)$ , température à laquelle 50 % de l'hybride sont dénaturés; et (b) % d'ARN-r marqué apparié ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  d'ADN fixé avant traitement par la ribonucléase). Ces deux paramètres sont dérivés de la courbe de dissociation de l'hybride. Après la simulation de l'étape d'hybridation suivant la méthode de De Smedt et De Ley (1977), la concentration en ADN est déterminée par la méthode de Richards (1974).



## CHAPITRE III: LA NODULATION CAULINAIRE DANS LE GENRE *AESCHYNOMENE*

### 1. INTRODUCTION

C'est en 1928 qu'un botaniste danois, Hagerup, a pour la première fois observé des nodules sur les tiges d'une légumineuse asiatique appartenant au genre *Aeschynomene*, *A. aspera*.

On connaît, à l'heure actuelle, une quinzaine d'espèces d'*Aeschynomene* portant des nodules fixateurs d'azote sur leur tige (Alazard, 1985). Cette propriété, bien que plus fréquemment observée dans le genre *Aeschynomene*, a aussi été mise en évidence chez une espèce de *Sesbania*, *S. rostrata* (Dreyfus et Dommergues, 1981; Planche I, figure 1) et chez une espèce de *Neptunia*, *N. oleracea* (Schaeede, 1940; Dreyfus *et al.*, 1984; Pl. I, fig. 2).

Il faut toutefois faire une distinction entre les nodules caulinaires de *S. rostrata* ou ceux d'*Aeschynomene*, formés tout au long de la tige de ces plantes au point d'émergence d'ébauches racinaires adventives, et ceux de *N. oleracea*. Les nodules de *N. oleracea* sont formés à l'aisselle de racines adventives qui se développent au niveau des noeuds de la tige de la plante lorsque celle-ci, qui est une herbe à tige rampante, est cultivée dans des sols inondés.

Quelques autres cas de nodulation sur des racines adventives aériennes ont été rapportés. Il s'agit, le plus souvent, d'une adaptation des plantes à des conditions de culture submergée. Citons les nodules formés sur les racines développées sur l'épécotyle de *Vicia faba* (Fyson et Sprent, 1980), sur l'hypocotyle d'*Arachis hypogaea* (Nambiar *et al.*, 1982) et surtout ceux formés tout le long de la tige de *Pentachletra maculosa* (Walter et Bien, 1989). Notons également la découverte récente, à l'île de la Réunion, de nodules aériens sur le tronc d'un arbre non-légumineux, *Casuarina cunninghamiana* (Prin *et al.*, 1991). Il semble, dans ce cas, que c'est l'eau de ruissellement le long des troncs qui soit responsable de l'apparition des racines adventives et de leur nodulation par l'actinomycète *Frankia*.

Le genre *Aeschynomene* est distribué principalement dans les régions d'Afrique, d'Amérique et d'Asie. Il appartient, comme *Arachis* et *Stylosanthes* à la tribu des *Aeschynomeneae*. Il comprend environ 160 espèces, tropicales pour la plupart, dont la moitié sont des espèces hydrophytes (Kretschmer et Bullock, 1979).

Au Sénégal, différentes *Aeschynomènes* poussent spontanément autour des mares permanentes ou temporaires pendant la saison des pluies qui s'étend de juillet à septembre. Les espèces que l'on peut rencontrer sont les suivantes: *A. afraspera*, *A. americana*, *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. indica*, *A. pfundii*, *A. schimperi*, *A. sensitiva*, *A. tambacoundensis* et *A. uniflora*. Excepté *A. afraspera*, chez qui la nodulation caulinare est naturellement fréquente et abondante (Pl. I, fig. 3), les autres espèces portent généralement des nodules caulinaires seulement sur la partie basse de leur tige, périodiquement soumise à l'immersion.

Les résultats présentés dans ce chapitre portent sur l'existence d'une spécificité d'hôte des rhizobia vis-à-vis de différentes espèces appartenant au genre *Aeschynomene* et sur la structure anatomique des sites de nodulation de ces espèces.

## 2. MISE EN EVIDENCE DE GROUPES D'INOCULATION CROISEE DANS LE GENRE AESCHYNOMENE

La spécificité d'hôte de 17 isolats de rhizobia provenant de nodules de tiges ou de racines de 10 Aeschynomènes originaires du Sénégal, a été testée sur diverses plantes hôtes. Les plantes hôtes sont, outre les 10 Aeschynomènes précitées, 11 autres Aeschynomènes provenant de la collection de l'IFAS (Université de Floride), *Sesbania rostrata*, *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis*, et *Macroptilium atropurpureum*. *S. rostrata* a été choisie en tant que plante à nodules de tiges d'un genre différent, *Arachis hypogaea* (Arachide) et *Stylosanthes guyanensis* en tant qu'espèces appartenant à la même tribu, et *Macroptilium atropurpureum* (Siratro) en tant que plante test des rhizobia du groupe cowpea. Quelques souches spécifiques de ces différentes plantes ont été incluses dans l'étude.

Les plantes ont été cultivées en milieu hydroponique (tubes de Gibson) et leurs racines et leur tige inoculées selon la technique décrite dans le chapitre II (Matériels et Méthodes). L'efficacité des souches de rhizobia a été estimée visuellement par la vigueur des plantes, la couleur de leurs feuilles et la mesure de l'activité réductrice d'acétylène des nodules. Le tableau 6 présente les résultats obtenus.

Le spectre de nodulation des différentes souches de rhizobia permet de distinguer trois groupes d'inoculation croisée dans le genre *Aeschynomene*. Le premier groupe comprend les espèces suivantes: *A. americana*, *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. falcata*, *A. fluminensis*, *A. histrix*, *A. pfundii*, *A. schimperii*, *A. villosa* et *A. uniflora*. Ce groupe de plantes est peu spécifique puisqu'il renferme également *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis*, et *Macroptilium atropurpureum*.

A l'exception d'*A. uniflora* (Pl. I, fig. 4), seule espèce de ce groupe de plantes à présenter de vrais nodules de tige, les autres espèces de ce groupe portent des nodules seulement sur leurs racines. Cependant, en conditions de culture inondée, des nodules sont formés sur la partie immergée des tiges d'*A. elaphroxylon* et d'*A. pfundii* (Pl. II, fig. 11). Enfin, *A. crassicaulis* est une herbe qui, dans la nature, flotte à la surface de l'eau, et dans ces conditions, des nodules sont formés sur sa tige au point d'émergence des racines adventives (Pl. I, fig. 5).

Le second groupe comprend seulement deux espèces, *A. afraspera* et *A. nilotica*. Ces deux espèces très voisines se caractérisent par une nodulation caulinaire abondante, facilement obtenue expérimentalement par une simple vaporisation d'une suspension diluée d'une culture de rhizobium spécifique.

Le troisième groupe de plantes renferme les espèces suivantes: *A. ciliata*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. indica*, *A. pratensis*, *A. rudis*, *A. scabra*, *A. sensitiva* et *A. tambacoundensis*. Ce groupe d'inoculation croisée de plantes est très spécifique. Toutes les plantes de ce groupe portent des nodules caulinaires lorsqu'elles sont inoculées par vaporisation d'une culture de rhizobium spécifique. Cependant, la nodulation est très dispersée et nettement moins abondante que chez *A. afraspera* ou *A. nilotica*.

Dans le genre *Aeschynomene*, il n'y a pas de spécificité de nodulation entre la tige et la racine. Toutes les espèces d'Aeschynomènes à nodules caulinaires forment des nodules à la fois sur leur tige et sur leur racines lorsqu'elles sont inoculées avec la même souche de rhizobium.

La plupart des rhizobia isolés des racines des plantes du groupe I (*A. elaphroxylon*) sont capables d'induire la formation de nodules sur les tiges et les racines des plantes du groupe II (*A. afraspera*). Les rhizobia isolés des plantes du groupe II ne produisent pas de nodules sur les racines des plantes du groupe I. En revanche, ils sont capables d'infecter les plantes du groupe III (*A. indica*) et d'y induire la formation de nodules souvent efficaces. Les rhizobia associés

Tableau 6 : Spécificité d'hôte et efficacité des souches de rhizobia d'*Aschynomene*.

Plantes-hôtes	Souches de rhizobia et hôte d'isolement																			
	<i>A. americana</i>	<i>A. pfundii</i>	<i>A. elaphroxylon</i>	<i>A. schimperi</i>	<i>A. uniflora</i>	<i>Ara-chis hypogaea</i>	<i>Macrotyloma canum</i>	<i>A. afraspera</i>	<i>A. indica</i>			<i>A. indica subsp.1</i>	<i>A. indica subsp.2</i>	<i>A. sen-sitiva</i>	<i>A. tambacoudensis</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>A. afraspera</i>			
	ORS 301	ORS 302	ORS 304	ORS 329	ORS 305	ORS 309	TAL 1000	CB 756	ORS 303	ORS 322	ORS 306	ORS 310	ORS 320	ORS 318	ORS 319	ORS 328	ORS 330	ORS 334	ORS 571	ORS 315
<i>A. americana</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. crassicaulis</i>	E	E	E	E	E	E	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. elaphroxylon</i>	E	E	<u>E</u>	<u>E</u>	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. falcata</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fluminensis</i>	E	E	E	E	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. histrix</i>	E	E	E	-	E	e	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. pfundii</i>	E	<u>E</u>	E	e	E	E	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. schimperi</i>	E	<u>E</u>	E	E	E	E	E	E	I	I	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. uniflora</i>	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	E	<u>E</u>	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. villosa</i>	-	<u>E</u>	<u>E</u>	-	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hypogaea</i>	E	I	-	E	E	B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. guyanensis</i>	E	E	I	E	E	-	e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. atropurpureum</i>	E	E	E	E	E	B	B	B	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. afraspera</i>	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	B	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-	-	<u>E</u>	-	-	-	-	-	I	I
<i>A. nilotica</i>	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	B	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	I	I
<i>A. ciliata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. denticulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. evenia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	E	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. indica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	e	e	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. pratensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>E</u>	I	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. rudis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	E	e	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. scabra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. sensitiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	B	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>A. tambacoudensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	-
<i>S. rostrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>E</u>	<u>E</u>

E, e, I et - signifient respectivement : nodulation racinaire efficace, peu efficace, inefficace et pas de nodulation. Les lettres soulignées indiquent la présence de nodules sur les tiges des plantes.

aux plantes du groupe III ont un spectre d'hôte très restreint. Excepté la souche ORS320, qui est capable de noduler *A. afraspera*, *A. nilotica* et quelques plantes du groupe I, les autres rhizobia isolés des plantes du groupe III induisent des nodules uniquement sur les plantes appartenant à ce même groupe d'inoculation.

Il est intéressant de noter que les souches d'*Azorhizobium caulinodans* ORS571 et ORS315 sont capables de noduler les tiges et les racines d'*A. afraspera* et *A. nilotica*, cependant les nodules formés sont inefficients.

### 3. STRUCTURE ANATOMIQUE DES SITES DE NODULATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES D'*AESCHYNOMENE*

La structure anatomique des sites de nodulation de 15 *Aeschynomènes* à nodulation caulinaire a été comparée (Alazard et Duhoux, 1988).

#### 3. 1 Méthodologie

Les plantes ont été cultivées dans des pots en matière plastique contenant 5 kg de sol maintenu sous une lame d'eau. Les espèces étudiées sont les suivantes: *A. afraspera* et *A. nilotica*; *A. ciliata*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. indica*, *A. pratensis*, *A. rudis*, *A. scabra*, *A. sensitiva* et *A. tambacoundensis*, *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. pfundii* et *A. uniflora*.

Des segments de tige de 3 à 5 mm de longueur, portant des sites de nodulation apparents prélevés au niveau du premier entre-noeud sur des plantes âgées de 9 semaines, sont fixés pendant une nuit à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate 0,2 M (pH 7,2). Les échantillons sont ensuite inclus dans du Paraplast (+) et les coupes obtenues au microtome Rotocut, colorées à l'hématoxyline ferrique de Regaud (Lison, 1960).

#### 3. 2 Résultats et discussion

Les nodules sur les tiges des différentes espèces d'*Aeschynomene* apparaissent au niveau de sites de nodulation préformés qui se présentent sous la forme de renflements plus ou moins importants. Les coupes histologiques de ces renflements montrent qu'ils correspondent toujours au point d'émergence d'une ébauche racinaire adventive en dormance.

La potentialité racinaire des primordia peut être confirmée expérimentalement: les sites de nodulation immergés dans l'eau donnent naissance à une racine qui s'allonge (Pl. I, fig. 6). Trois types de structure anatomique des sites de nodulation peuvent être observés parmi les différentes *Aeschynomènes* à nodulation caulinaire. Ils diffèrent entre eux par le stade de développement de l'ébauche racinaire.

*A. afraspera* et *A. nilotica* qui, dans la nature portent en abondance des nodules sur leur tige, présentent la structure la plus évoluée (Pl. II, fig. 7 et 8). Chez ces espèces, le site de nodulation est constitué par un dôme épidermique proéminent et un primordium racinaire dont l'apex est simplement recouvert par une couche de cellules épidermiques applaties. Une cavité annulaire est dégagée entre la base du primordium racinaire et les tissus corticaux de la tige. Des déchirures dans la couche de cellules épidermiques, provoquées par la poussée du primordium racinaire sous-jacent, rendent le site de nodulation facilement accessible aux rhizobia spécifiques.

Le groupe de plantes représenté par *A. indica*, qui comprend les plantes constituant le groupe d'inoculation croisée III, présente une structure du site de nodulation moins développée (Pl. II, fig. 9 et 10). Le primordium racinaire affleure sous l'épiderme de la tige en formant un léger renflement. Il n'y a pas de cavité circulaire autour du primordium et son apex est recouvert

par une couche de cellules épidermiques intactes. Le degré d'humidité de l'air, très élevé durant la saison des pluies dans les régions tropicales, est généralement suffisant pour lever la dormance d'une partie des sites de nodulation chez ces espèces d'*Aeschynomene*.

Le troisième groupe de plantes représenté par *A. elaphroxylon*, qui comprend les plantes du groupe d'inoculation croisée I dont la nodulation caulinaire est limitée à la partie basse de la tige, est caractérisé par la structure des sites la moins évoluée (Pl. II, fig. 11 et 12). Le primordium racinaire est inclus dans les tissus corticaux de la tige. L'immersion de la tige est nécessaire pour que le primordium racinaire se développe suffisamment afin de pouvoir être infecté par les rhizobia.

*A. uniflora* constitue un cas particulier. Cette espèce, nous l'avons vu, est la seule du groupe d'inoculation croisée I à porter de nombreux nodules sur sa tige. Cependant, cette nodulation caulinaire relativement abondante n'est observée qu'en saison chaude et humide. Pendant la saison sèche, les sites de nodulation d'*A. uniflora* présentent une structure anatomique similaire à celle des autres membres de ce groupe de plante. Par contre, pendant la saison des pluies, le développement de l'ébauche racinaire est tel que l'apex du primordium racinaire perce l'épiderme de la tige.

La comparaison des sites de nodulation des différentes espèces d'*Aeschynomene* permet de classer ces espèces en 3 groupes selon le stade de développement des ébauches racinaires présentes sur leur tige. Dans tous les cas, la dormance des sites de nodulation peut être levée par l'immersion des tiges.

C'est le type de structure des sites de nodulation qui détermine l'accessibilité du site pour le rhizobium et par conséquent, la fréquence de la nodulation caulinaire dans le groupe de plantes considéré. Il est remarquable que la classification des *Aeschynomènes* selon la structure anatomique de leurs sites de nodulation coïncide avec la classification établie en fonction de la spécificité d'hôte des plantes pour les souches de rhizobia.

Notons, pour terminer, que la présence de poils absorbants n'a jamais été observée au niveau des sites de nodulation des différentes *Aeschynomènes*.





## CHAPITRE IV : LA SYMBIOSE ENTRE *RHIZOBIUM* ET *AESCHYNOMENE AFRASPERA*

### 1. INTRODUCTION

Quelques espèces d'*Aeschynomene* sont cultivées pour leur intérêt agronomique (Allen et Allen, 1981). C'est le cas d'*A. americana* utilisée comme couvert végétal dans les plantations de Teck sur les côtes marécageuses de Java ou comme engrais vert ou fourrage en Amérique tropicale, en Indonésie et plus récemment dans les états du sud des Etats-Unis. *A. fluitans* présente, elle aussi, une excellente valeur fourragère, de même que *A. indica* avant que les tiges de cette dernière ne soient trop lignifiées.

Parmi les différentes *Aeschynomènes* à nodules caulinaires, *A. afraspera* et *A. nilotica* se caractérisent par une nodulation caulinaire abondante. Cette propriété laisse supposer une plus grande capacité de fixation d'azote chez ces espèces et par conséquent, un intérêt agronomique plus important.

Sur le plan morphologique, *A. afraspera* et *A. nilotica* sont des plantes très semblables, excepté une taille légèrement supérieure de la plante dans son ensemble pour *A. nilotica*, et une différence au niveau des gousses, celles d'*A. afraspera* présentant une marge verruqueuse à l'âge adulte.

Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement *A. afraspera* en raison de sa présence naturelle dans la zone géographique où l'étude a été conduite.

*Aeschynomene afraspera* J. Léonard, *Aeschynomène* âpre d'Afrique (du latin *afra*, d'Afrique et *aspera*, âpre) est assez répandue sur tout le continent africain et ressemble à l'espèce *Aeschynomene aspera* L., originaire des Indes (Berhaut, 1976). C'est une plante annuelle, haute de 1 m à 1 m 50, fréquemment rencontrée sur le bord des mares temporaires pendant la saison des pluies qui s'étend, au Sénégal, du mois de juillet jusqu'au mois de septembre (Alazard et Duhoux, 1987).

*A. afraspera* est très sensible aux variations climatiques, en particulier à la température et à la photopériode. En période humide, lorsque les jours sont longs (photopériode de 13 h, température du jour de 32 °C en moyenne) les plantes, après trois mois de culture à la station de Bel-Air à Dakar, sont au stade de la floraison et atteignent une hauteur de 2 m. Pendant la saison sèche, les jours sont plus courts et la température plus fraîche (11 h de photopériode et 23 °C pour la température diurne) et la floraison intervient alors que les plantes sont âgées de six semaines et ont une taille d'environ 60 cm. Il faut noter également, en période de jours courts, une nette tendance au plagiotropisme de cette plante.

### 2. INOCULATION ET NODULATION DES TIGES D'*A. AFRASPERA*

L'inoculation artificielle des tiges d'*A. afraspera* par vaporisation (ou à l'aide d'un pinceau) d'une suspension diluée d'une culture de rhizobium spécifique - la souche ORS322 par exemple - produit une nodulation abondante et régulière. Les nodules apparaissent seulement sur la partie de la tige qui a été inoculée. Les nodules n'apparaissent pas sur les portions de tige non inoculées ou sur celles qui se sont développées après l'inoculation. Cela

signifie que l'infection ne se propage pas de l'"intérieur", par l'intermédiaire de la vascularisation de la tige.

Par l'inoculation répétée de la tige d'une plante en développement, on peut obtenir jusqu'à 12 g de nodules frais pour une plante d'une hauteur de 1 m 50.

Dans la nature, la nodulation caulinaire est fréquente et parfois abondante. Les nodules sont répartis au hasard tout au long de la tige et des branches latérales des plantes. Le vent, la pluie, les insectes et les animaux semblent jouer un rôle important en tant que vecteur de l'inoculation.

Les plantes à nodules caulinaires se développant le plus souvent en milieu inondé, peu favorable à la nodulation de leur racines, la nodulation caulinaire a été interprétée comme le résultat de l'adaptation de ces plantes à leur environnement (Hagerup, 1928). Cependant, des conditions de culture inondée ne sont pas obligatoires pour la nodulation des tiges des *Aeschynomènes*.

Les sites de nodulation sur les tiges et les branches d'*A. afraspera* apparaissent régulièrement au cours du développement de la plante. Ils se présentent sous l'aspect de petits renflements d'environ 1 mm de diamètre disposés au hasard sur de très nombreuses génératrices verticales (Pl. III, fig. 13). Cependant, seuls les sites matures, bien développés, généralement localisés en dessous du deuxième noeud à partir du sommet, sont sensibles à l'infection.

Les nodules de tiges - ou de racines (Pl. III, fig. 14) - apparaissent 4 à 5 jours après l'inoculation et ils sont parfaitement développés et efficaces 15 jours plus tard. Ils ont une forme hémisphérique très largement accolée sur la tige, le diamètre de leur base varie entre 3 et 5 mm et leur élévation de 2 à 3 mm (Pl. III, fig. 15 et 16). Les nodules caulinaires ont un cortex extérieur chlorophyllien de couleur vert foncé comme la tige de la plante. En coupe transversale, ils présentent un tissu central de couleur rougeâtre due à la présence de la lèghémoglobine (Pl. II, fig. 7, double flèche). Leur morphologie est celle de nodules à croissance déterminée, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas de méristème apical (Goodchild, 1977).

### 3. ESTIMATION DU POTENTIEL FIXATEUR D'AZOTE D'*A. AFRASPERA*

Le potentiel fixateur d'azote d'*Aeschynomene afraspera* a été estimé à la fois par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de ses nodules de tige et de racines, et par la méthode dite "des différences" (Weber, 1966), qui consiste à mesurer la différence entre la teneur en azote total d'une plante fixatrice d'azote (ou inoculée) et celle d'une plante non fixatrice (ou non inoculée).

#### 3. 1 Activité réductrice d'acétylène des nodules de tige et de racines d'*A. afraspera*

Le tableau 7 présente l'activité fixatrice d'azote estimée par la mesure de l'ARA des nodules de tige et de racines de plantes d'*A. afraspera* après 9 semaines de culture. L'ARA des nodules dépend de l'âge des nodules et de la saison pendant laquelle les plantes ont été cultivées. En général, l'activité des nodules est optimale 15 jours après l'inoculation et les nodules restent actifs durant 8 semaines lorsque les plantes sont cultivées pendant la saison chaude et humide, tandis qu'en saison sèche et fraîche, la durée d'activité des nodules est seulement de 3 à 4 semaines. Dans le cas présent, les plantes ayant été cultivées en saison chaude, l'ARA des nodules est mesurée 4 semaines après l'inoculation.

Partie de la plante	Nodules par plante		ARA	ARA spécifique
			( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{plante/h}$ )	( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{g nodules PS/h}$ )
	Poids sec (mg)	Nombre		
Tiges	$605 \pm 57$	$145 \pm 12$	$187 \pm 13$	$309 \pm 27$
Racines	$43 \pm 11$	$19 \pm 4$	$5 \pm 2,5$	$116 \pm 23$

Les chiffres sont la moyenne de 5 répétitions

**Tableau 7:** Activité réductrice d'acétylène (ARA) des nodules de tige et de racines d'*Aeschynomene afraspera*.

*A. afraspera* présente un potentiel fixateur d'azote élevé. L'ARA spécifique des nodules de tige est de 309  $\mu\text{moles}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$  de nodules P.S./h. A titre de comparaison, les valeurs obtenues avec d'autres espèces à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata* (Dreyfus et Dommergues, 1981) et *Aeschynomene scabra* (Eaglesham et Szalay, 1983) sont respectivement de 259 et 327  $\mu\text{moles}$   $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$  de nodules P.S./h, tandis que les valeurs d'ARA spécifique des nodules de racines de légumineuses à graines comme *Vigna*, *Vicia* ou *Lupinus* varient entre 180 et 250  $\mu\text{moles}$   $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$  de nodules P.S./h (Graham et Chatel, 1983).

La nodulation racinaire d'*A. afraspera* est faible en conditions inondées. Les nodules racinaires sont de petite taille et ont une ARA spécifique nettement plus faible que celle des nodules de tige. Il ne fait aucun doute que l'inondation affecte le développement et l'activité des nodules de racines.

### 3. 2 Estimation de la fixation d'azote par la méthode des différences

L'estimation de la fixation d'azote par les nodules de tige d'*A. afraspera* selon la méthode des différences est rapportée au tableau 8. Cette étude a porté sur un lot de plantes dont les tiges et les racines ont été inoculées et sur un autre lot de plantes dont seulement les racines ont été inoculées. Les plantes ont été cultivées en vase de végétation (3 plantes par cylindre). Au moment de la récolte, après 2 mois de culture, les plantes dont les tiges et les racines ont été inoculées atteignent 1,20 m de hauteur et le poids sec de leur partie aérienne est de 46 g, tandis que celles inoculées sur leurs racines seulement ne mesurent qu'environ 0,50 m pour un poids sec de 8 g. La teneur en azote des plantes nodulées sur leur tige est relativement élevée, 3 % du poids sec. Le contenu en azote total de ces plantes est de 1366 mg de N par plante alors que celui des plantes nodulées seulement sur leur racines est de 158 mg. Calculée par différence entre ces valeurs, la fixation d'azote due aux seuls nodules de tige est de 1208 mg de N, soit 90 % de la teneur en azote total.

Il est probable que cette valeur soit surestimée car la méthode de mesure considère que les deux systèmes racinaires sont semblables dans les deux traitements. En réalité, la plus grande vigueur des plantes inoculées sur les tiges doit également se traduire par un développement supérieur du système racinaire de ces plantes et, par conséquent, une assimilation plus importante de l'azote du sol.

### 3. 3 Discussion

Sur la base des cultures en cylindres, chacun contenant 3 plantes pour une surface de 0,07 m<sup>2</sup>, la fixation de l'azote par les plantes nodulées sur leur tige, calculée par extrapolation, s'élève à 51,3 g de N par m<sup>2</sup> après 2 mois de culture. Cette valeur, supérieure à celle obtenue avec *Sesbania rostrata*, 30 g par m<sup>2</sup> (Rinaudo et Moudiongui, 1985), indique qu'*A. afraspera* peut être considérée comme l'une des plus performantes parmi les légumineuses fixatrices d'azote.

La rapidité de croissance d'*A. afraspera*, sa teneur en azote élevée, et la présence sur ses tiges de nodules qui lui confèrent l'aptitude à fixer l'azote en conditions inondées, sont autant de propriétés intéressantes pour une utilisation agronomique de cette plante en tant qu'engrais vert dans la riziculture en milieu tropical.

Traitement	Poids sec par plante (g par plante)	Teneur en azote des plantes	
		% du poids sec	mg N/plante
Tiges et racines inoculées	$46 \pm 3,5$	$2,97 \pm 0,15$	$1366 \pm 125$
Racines inoculées	$8,0 \pm 1,3$	$1,97 \pm 0,10$	$158 \pm 18$
Les valeurs sont la moyenne de 5 répétitions			

**Tableau 8:** Effet de l'inoculation des tiges sur la croissance et la teneur en azote des plantes d'*Aeschynomene afraspera*.

#### 4. EFFET DE L'AZOTE COMBINÉ SUR LA NODULATION ET LA FIXATION DE L'AZOTE CHEZ *A. AFRASPERA*

##### 4.1 Introduction

La nutrition azotée des légumineuses peut s'effectuer soit en utilisant l'azote atmosphérique après sa réduction en ammoniacque par la nitrogénase des bactéroïdes, soit, comme toutes les plantes, par l'assimilation de l'azote combiné du sol. Il existe une compétition entre ces deux modes de nutrition au détriment, le plus souvent, de l'azote atmosphérique.

Si de faibles concentrations en nitrates sont favorables à la croissance de la plante tout en maintenant une activité fixatrice intacte, des concentrations élevées en nitrate inhibent totalement la fixation symbiotique de l'azote par les nodules. Ainsi, chez le soja, la proportion d'azote assimilé provenant de la fixation symbiotique peut varier entre 25 et 75 % selon la teneur en azote combiné du sol.

Outre les effets inhibiteurs sur l'initiation et le développement des nodules (Munns, 1968; Latimore *et al.*, 1977), les nitrates provoquent une importante inhibition de la fixation de l'azote atmosphérique (Rigaud, 1976; Gibson et Pagan, 1977; Streeter, 1981). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène dépressif des nitrates (Munns, 1977; Rigaud, 1981). En mobilisant, au niveau foliaire, une importante quantité de substrats énergétiques, la réduction des nitrates provoquerait un déficit en molécules carbonées au sein des nodules. D'autre part, la toxicité du nitrite provenant de la réduction du nitrate, pourrait intervenir directement au niveau des nodules. L'inhibition de la fixation de l'azote par l'azote combiné dépend aussi de la forme d'azote combiné, de l'espèce de légumineuse ou de rhizobium considérée, de la nature du sol, et des conditions de culture des plantes (Eaglesham *et al.*, 1983).

Chez les légumineuses à nodules caulinaires comme *Sesbania rostrata* (Dreyfus et Dommergues, 1980; Moudiongui et Rinaudo, 1987) ou *A. indica* (Eaglesham et Szalay, 1983) l'effet inhibiteur de l'azote combiné est plus marqué sur la fixation de l'azote par les nodules de racines que sur la fixation par les nodules de tiges.

Nous nous proposons de déterminer l'effet de l'azote combiné sur le potentiel fixateur d'azote d'*A. afraspera* en culture hydroponique et en culture au champ (Becker *et al.*, 1986).

##### 4. 2 Résultats

###### 4.2.1 Effet de l'azote combiné sur les cultures hydroponiques d' *A. afraspera*

L'expérience a consisté à déterminer l'effet de la concentration en nitrate, d'une part sur l'activité fixatrice d'azote des nodules déjà formés, et d'autre part sur la formation des nodules de tiges et de racines et leur efficacité respective.

Lorsque le nitrate (sous la forme de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) est ajouté au milieu de culture des plantes, l'activité réductrice d'acétylène (ARA) des nodules racinaires est plus sévèrement inhibée que celle des nodules de tige (figure 1). Dans le cas des nodules caulinaires, il n'y a pas d'inhibition de l'activité nitrogénase jusqu'à une concentration de 6 mM d'azote, tandis que l'activité des nodules racinaires est réduite de 50 % en présence de seulement 3 mM d'azote.

L'effet de la concentration en nitrate sur la formation des nodules et leur activité nitrogénase en cultures hydroponiques est rapportée sur le tableau 9. L'augmentation de la concentration en nitrate au-delà de 3 mM se traduit par une diminution rapide du nombre de nodules de racines tandis que la formation des nodules de tiges n'est pas affectée, même en présence de 15 mM d'azote. En ce qui concerne l'activité des nodules formés en présence de nitrate, l'activité nitrogénase spécifique des nodules de racines diminue de 50 % lorsque les

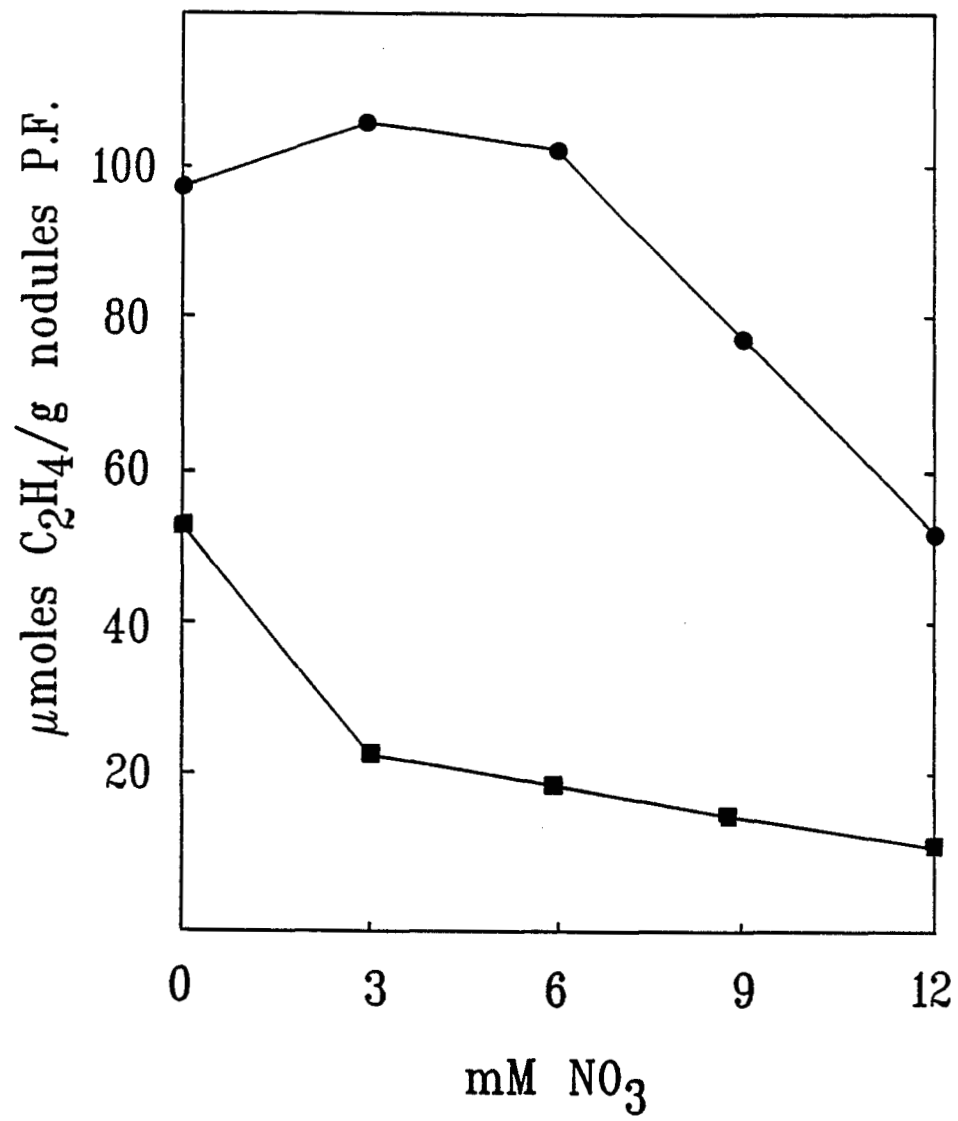


Figure 1 : Effet du nitrate sur l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinares (●) et racinaires (■) d'*A. afraspera*.

mM NO <sub>3</sub> /l	0	3	6	9	12	15
Poids frais/plante (g)	4,1 b	5,5 a	5,3 a	5,5 a	5,4 a	5,5 a
<b>Parties aériennes:</b>						
nombre de nodules	10,0 b	11,8 a	13,0 a	13,0 a	12,2 a	13,0 a
ARA spécifique (μmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g de nodules)	69,2 a	69,6 a	58,8 b	47,6 c	42,0 c	35,1 d
<b>Racines:</b>						
nombre de nodules	51,0 a	50,0 a	39,0 b	25,0 c	25,0 c	12,0 d
ARA spécifique (μmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g de nodules)	45,8 a	23,5 b	14,9 c	11,1 d	8,5 d	5,0 e
% N dans la matière sèche	4,4 d	4,9 c	5,0 b	5,1 b	5,2 a	5,3 a

Les moyennes suivies de la même lettre sur chaque ligne ne sont pas significativement différentes (P=0,05, test de Duncan)

**Tableau 9 :** Effet du nitrate sur la fixation de l'azote et la croissance d'*A. afraspera* en cultures hydroponiques.



plantes sont cultivées en présence de 3 mM de nitrate. Le même degré d'inhibition n'est obtenu pour les nodules caulinaires qu'en présence de 15 mM de nitrate.

Les plantes cultivées en milieu sans azote sont moins développées que les plantes cultivées en présence de nitrate, car, du fait de la courte durée de l'expérience, l'apport d'azote par la fixation biologique est intervenu plus tardivement dans la nutrition azotée des plantes.

#### 4.2.2 Effet de l'urée sur le potentiel fixateur d'azote d'*A. afraspera* cultivée au champ

L'effet de la concentration en azote combiné sur la croissance des plantes cultivées en vase de végétation est présenté sur le tableau 10. En présence d'azote minéral, les plantes cultivées sur sol ont une réponse analogue à celle observée en cultures hydroponiques. L'effet dépressif de l'azote combiné se manifeste sur la nodulation racinaire à partir de 50 kg d'azote par ha. La fertilisation azotée, jusqu'à 100 kg de N par ha, stimule aussi bien la croissance des plantes que l'activité et le nombre de nodules formés sur les tiges d'*A. afraspera*. L'apport d'une forte dose d'azote (200 kg/ha) dépasse la quantité optimale d'azote requise pour le développement de la plante; ceci laisse supposer qu'*A. afraspera* est une plante sauvage mal adaptée à la présence de concentrations en azote élevées dans le sol.

#### 4.2.3 Effet du phosphore et du potassium

La figure 2 présente la réponse à la fertilisation en phosphore et en potassium d'*A. afraspera* cultivée sur un sol très pauvre en éléments minéraux (sol de dune, tableau 5). Lorsque le sol est carencé en phosphore, la croissance des plantes est extrêmement faible quelle que soit la quantité de potassium apporté. Comme chez le Pois (Jakobsen, 1985), l'effet du phosphore est nettement plus prononcé que celui du potassium. La fertilisation combinée P + K permet d'augmenter à la fois la croissance et la fixation d'azote par *A. afraspera*.

### 4.3 Discussion

La nodulation racinaire chez *A. afraspera*, comme chez les autres légumineuses, est fortement inhibée en présence de fortes concentrations en azote combiné. En revanche, comme les autres légumineuses chez lesquelles la nodulation caulinaires a été décrite, l'azote combiné a un effet nettement moins marqué sur la formation et l'activité des nodules de tiges (Dreyfus et Dommergues, 1980; Eaglesham et Szalay, 1983; Moudiongou et Rinaudo, 1987). Cette propriété permet à ces plantes d'utiliser à la fois l'azote atmosphérique et l'azote du sol.

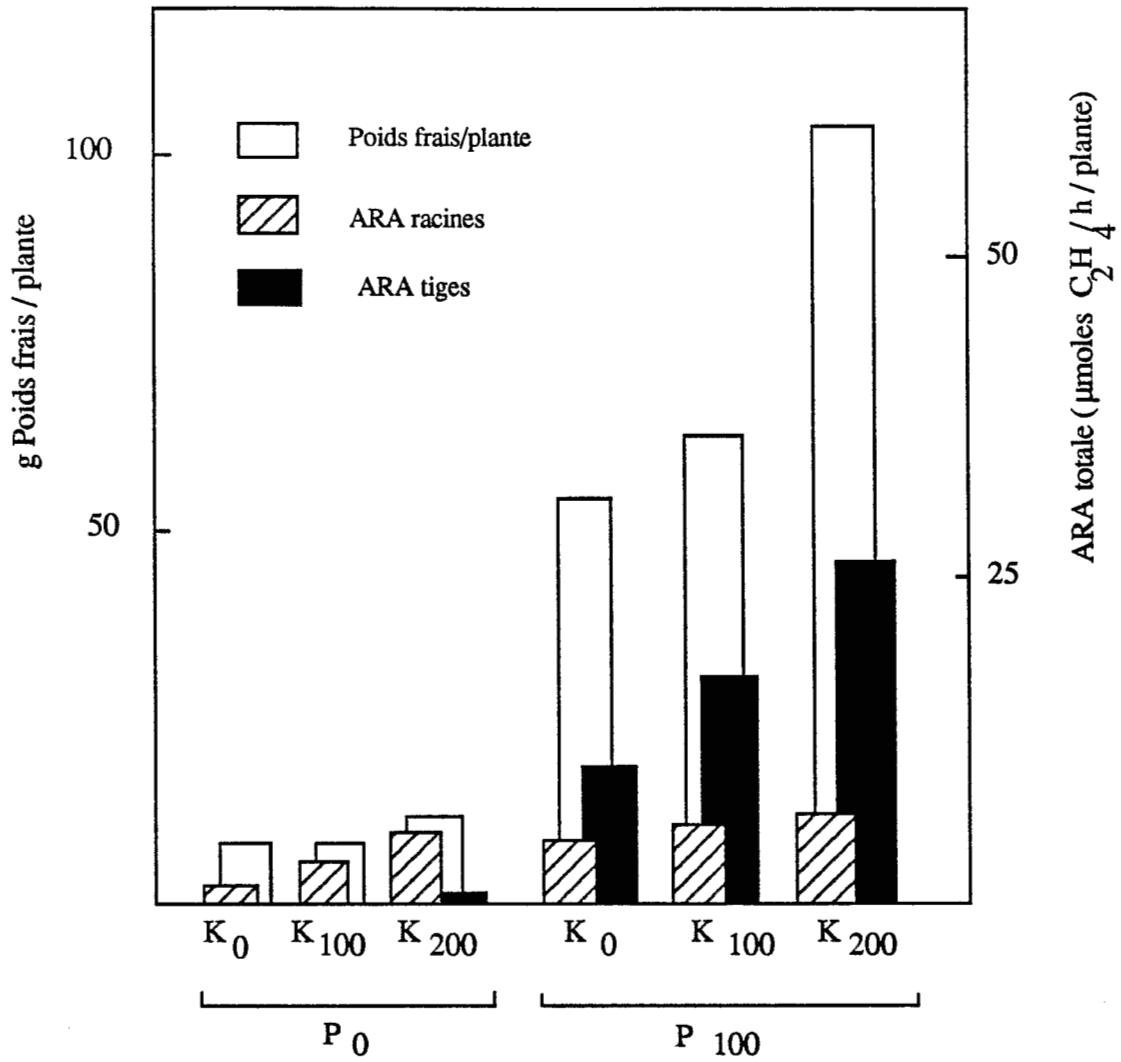
La relative indépendance des nodules caulinaires vis-à-vis de l'azote combiné peut s'expliquer par la position exceptionnelle et par la morphologie particulière de ces nodules. En effet, les nodules caulinaires ne sont exposés directement, ni à l'azote du sol, ni au nitrate transporté par le xylème de la plante. De plus, le cortex externe des nodules caulinaires étant chlorophyllien, il est possible que, dans une certaine mesure, ces nodules puissent fonctionner comme des unités autonomes du point de vue énergétique.

Enfin, *A. afraspera* est très sensible à la fertilisation en phosphore et à un degré moindre en potassium. En conséquence, dans les sols très dégradés, l'utilisation d'*A. afraspera* en tant qu'engrais vert nécessitera qu'une fumure PK soit appliquée de préférence au moment de la culture de cette plante.

Kg N / ha (urée)	0	50	100	200
Poids frais/plante (g)	86,2 d	102,2 c	158,1 a	122,8 b
Poids sec/plante (g)	32,2 d	37,9 c	54,6 a	43,4 b
% N dans la matière sèche	3,2 c	3,4 b	3,6 b	3,9 a
<b>Parties aériennes:</b>				
nombre de nodules	170 c	199 b	259 a	212 b
Poids frais de nodules (mg)	910 b	1040 b	1520 a	1470 a
ARA spécifique ( $\mu$ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g P.F. de nodules)	89,5 a	87,2 b	86,0 b	68,7 a
<b>Systèmes racinaires:</b>				
nombre de nodules	50 a	50 a	43 b	30 b
Poids frais de nodules (mg)	540 a	534 a	500 b	380 c
ARA spécifique ( $\mu$ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g P.F. de nodules)	28,6 a	29,5 a	20,4 b	9,8 c

Sur chaque ligne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % (test de Duncan)

**Tableau 10 :** Effet de différentes doses d'urée sur la fixation d'azote et la croissance d'*A. afraspera* cultivée en vases de végétation.



**Figure 2:** Effet de l'application du phosphore et du potassium (en mg/kg de sol) sur la production de biomasse et la fixation de l'azote par *A. afraspera*

## 5. APPLICATIONS AGRONOMIQUES

### 5. 1 Introduction

L'emploi des engrais verts consiste à enfouir dans le sol, des plantes d'espèces diverses arrivées à un certain degré de maturité. Le plus souvent, ces plantes sont des légumineuses. Elles sont enfouies directement dans le sol par labourage, avant que ne soient mises en culture les céréales et les autres plantes vivrières incapables d'avoir de bons rendements sans apport d'engrais azotés.

En Asie du Sud-Est, les engrais verts, qu'il s'agisse d'*Azolla* ou de légumineuses, sont utilisés depuis très longtemps dans la riziculture traditionnelle. Ce n'est malheureusement pas le cas dans la plupart des pays en voie de développement, en Afrique notamment, où cette pratique est peu intégrée dans les systèmes culturels traditionnels.

Pourtant dans ces régions poussent des légumineuses dont la capacité de fixation de l'azote est parmi les plus élevées connues à ce jour. C'est le cas de *Sesbania rostrata*, capable de fixer, dans certaines conditions, jusqu'à 270 kg d'azote par hectare en deux mois de culture. Son utilisation comme engrais vert en microparcelles expérimentales a permis de doubler les rendements en grains du riz (Rinaudo *et al.*, 1983).

En raison du potentiel fixateur d'azote exceptionnel que présentent, comme nous venons de le voir, *Aeschynomene afraaspera* mais aussi *A. nilotica*, il était intéressant de tester leur utilisation en tant qu'engrais vert (Alazard et Becker, 1987).

### 5. 2 Résultats

#### 5. 2. 1 Productivité de l'engrais vert

Les productivités végétales d'*A. afraaspera* et d'*A. nilotica* sont données au tableau 11. Les deux espèces poussent très rapidement, atteignant une hauteur de 1,50 m après 7 semaines de culture. La production de biomasse végétale et la teneur en azote d'*A. nilotica* sont significativement supérieures à celles d'*A. afraaspera*. Pour une densité de culture de 60 plantes/m<sup>2</sup>, les plantes nodulées sur leur tige d'*A. nilotica* accumulent 53,2 g de N en 7 semaines tandis que celles d'*A. afraaspera* n'en accumulent que 42,3 g. Les deux espèces ont cependant la même teneur relative d'azote, environ 3 % du poids sec.

#### 5. 2. 2 Effet engrais vert

L'effet de l'engrais vert *Aeschynomène* est présenté sur le tableau 12. Les microparcelles ayant reçu l'engrais vert produisent 2 fois plus de matière végétale sèche (grains et pailles) que les parcelles témoins. Par rapport aux parcelles fertilisées avec l'urée, la production est également nettement supérieure. De même, les teneurs en azote des grains et des pailles du riz sont significativement supérieures dans les parcelles fertilisées avec les *Aeschynomènes*. L'engrais vert a également un effet déterminant sur le nombre de panicules.

Le rendement d'incorporation de l'azote, calculé par le rapport du contenu en azote du riz sur l'azote total apporté, est meilleur dans le cas de l'engrais vert *A. afraaspera* (35 %) que pour l'engrais vert *A. nilotica* ou l'engrais azoté (25 %).

### 5. 3 Discussion

La pratique des engrais verts est généralement reconnue comme étant le moyen de transfert le plus efficace de l'azote fixé aux plantes (Dommergues, 1982). L'extrapolation au

Plantes	Production végétale			Azote total
	Poids frais (kg / m <sup>2</sup> )	Poids sec (kg / m <sup>2</sup> )	Teneur en azote (% du P.S.)	(g / m <sup>2</sup> )
<i>A. afraspera</i>	7,5 a	1,6 a	2,7	42,3 a
<i>A. nilotica</i>	9,2 b	1,9 b	2,8 a	53,2 b

Dans chaque colonne de chiffres, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas différentes (P=0,05)

**Tableau 11:** Production végétale et teneur en azote des Aeschynomènes après 7 semaines de culture

Traitement	Rendement en riz				Teneur en azote du riz (gm <sup>-2</sup> )	Nombre de panicules du riz (m <sup>-2</sup> )	Augmentation du rendement en grains (%)	N tranféré à la récolte du riz (% de l'azote ajouté)
	grains		pailles					
	(g PS.m <sup>-2</sup> )	(%N)	(g PS.m <sup>-2</sup> )	(%N)				
<i>A. afraspera</i>	881 a	1,50 a	1077 a	0,91 a	23,9 a	193 a	82	35
<i>A. nilotica</i>	895 a	1,45 a	1001 a	0,95 a	22,4 a	190 a	85	25
Fertilisation (100 kg N.ha <sup>-1</sup> )	612b	1,20 b	780 b	0,52 b	11,4 b	145 b	27	24
Témoin	483 c	1,20 b	610 c	0,53 b	9 c	123 b	-	-

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % (test de Duncan)

**Tableau 12:** Effet de l'engrais vert *Aeschynomene* sur la production et la teneur en azote du riz

champ des résultats rapportés ci-dessus, malgré toutes les réserves qui doivent être émises en pareil cas, donne une production de 9 tonnes de grains de riz par hectare. Par comparaison, l'extrapolation d'une expérimentation similaire conduite avec *Sesbania rostrata* (Rinaudo *et al.*, 1983) fournissait un rendement de 6 tonnes de riz par hectare.

Les Aeschynomènes apportent ainsi une quantité importante d'azote au sol dont une partie contribue à l'augmentation du rendement de production de la culture du riz. Elles fournissent également une quantité importante de matière organique qui améliore la structure du sol et augmente sa fertilité. De plus, il est possible qu'une partie de l'azote incorporé dans le sol qui n'a pas été utilisé par le riz, reste disponible pour une seconde culture.

Néanmoins, plusieurs facteurs doivent être pris en considération dans une perspective d'utilisation agronomique: les conditions écologiques de l'aire d'exploitation et les faiblesses intrinsèques des légumineuses à nodules caulinaires (exigence en eau, nécessité d'inoculer, sensibilité des plantes à la photopériode, compétition avec les mauvaises herbes). Le facteur humain n'est, de plus, pas à négliger. En effet, l'un des grands problèmes à l'essor des agrosystèmes dans les pays en voie de développement est de convaincre les paysans à rompre leurs habitudes culturelles au profit de nouvelles qui permettraient d'augmenter les rendements. Par ailleurs, le surplus de travail à fournir, alors que les engrais verts ne sont pas des plantes vivrières, risque d'être une raison supplémentaire pour ces paysans de ne pas utiliser cette technologie.





## CHAPITRE V : DEVELOPPEMENT DES NODULES CAULINAIRES CHEZ *AESCHYNOMENE AFRASPERA*

### 1. INTRODUCTION

Nous avons rappelé, dans l'introduction générale, les différents processus d'infection conduisant à la formation des nodules fixateurs d'azote sur les racines et, quelquefois, sur les tiges des légumineuses.

Parmi les légumineuses à nodulation caulinaire, *Sesbania rostrata* est l'espèce chez laquelle le mode d'infection des tiges a été le mieux décrit (Tsien *et al.*, 1983; Duhoux, 1984). Le processus d'infection de la tige de *Sesbania rostrata* est unique parmi les légumineuses car on y trouve à la fois une invasion intercellulaire initiale des rhizobia comme chez l'Arachide, et la formation de cordons d'infection comme chez les légumineuses tempérées. En outre, les cordons d'infection ne sont pas issus d'un poil absorbant mais d'une poche intercellulaire dans laquelle se sont multipliés les rhizobia.

Les connaissances sur le mode d'infection des légumineuses à nodules caulinaires du genre *Aeschynomene* sont peu développées. Les données de la littérature concernent essentiellement la structure des nodules de tiges et de racines d'*A. indica* déjà établis (Arora, 1954, Yatazawa *et al.*, 1984; Vaughn et Ellmore, 1985). Ces auteurs n'ayant jamais observé la présence de poils absorbants ni celle de cordons d'infection, il a été naturellement admis que les rhizobia infectaient ces plantes après pénétration d'abord intercellulaire au point d'émergence des racines latérales adventives, puis directement intracellulaire selon un processus analogue à celui décrit chez l'Arachide.

Grâce à la facilité avec laquelle une nodulation caulinaire régulière et abondante peut être obtenue expérimentalement chez cette plante, *A. afraspera* constitue un modèle de choix pour l'étude des étapes précoces de la formation des nodules de tige (Alazard et Duhoux, 1990).

### 2. STRUCTURE ANATOMIQUE DES SITES DE NODULATION SUR LES TIGES D' *A. AFRASPERA*

Comme les autres légumineuses à nodules de tige, les nodules formés sur les tiges d'*A. afraspera* apparaissent en des sites prédéterminés, développés indépendamment de toute infection bactérienne.

Les sites de nodulation sur les tiges d'*A. afraspera* sont constitués par un dôme épidermique dont la formation est due à la présence d'un primordium racinaire sous-jacent. Un site de nodulation est sensible à l'infection seulement lorsqu'une cavité circulaire est dégagée entre le primordium racinaire et le cortex de la tige (voir chapitre III). En coupe longitudinale, on distingue un méristème radiculaire à l'apex du primordium racinaire, et dans la partie basale, un cortex et un cylindre central qui se raccorde la vascularisation de la tige (Pl. IV, fig. 17). L'apex du primordium est simplement recouvert par une pellicule épidermique très aplatie présentant des déchirures (Pl. IV, fig. 18) qui permettront l'accès ultérieur des rhizobia à la cavité interne du site de nodulation.

### 3. INFECTION DU SITE DE NODULATION

Les différentes étapes de l'ontogénèse des nodules ont été suivies parallèlement, en microscopie photonique et en microscopie électronique.

#### 3. 1 Pénétration des rhizobia

Après avoir franchi la mince pellicule épidermique recouvrant le site de nodulation au niveau des déchirures provoquées par la poussée du primordium racinaire sous-jacent, les rhizobia atteignent le fond de la cavité annulaire dégagée autour de la base du primordium racinaire. La zone d'infection est limitée à la base du primordium racinaire.

Au point de jonction entre le cortex externe du primordium racinaire et l'épiderme de la tige, les rhizobia s'engouffrent dans les espaces intercellulaires et dans les cellules qui présentent une interruption pariétale résultant des forces mécaniques associées au développement du primordium racinaire (Pl. IV, fig. 19). Une phase de multiplication intense a lieu dans ces structures ouvertes.

#### 3. 2 Infection intracellulaire

Entre 24 heures et 48 heures après l'inoculation, on observe au voisinage du fond de la cavité la présence d'une cellule très élargie, à forme étoilée, possédant un noyau et un nucléole très volumineux (Pl. V, fig. 20, 21 et 22). Cette cellule, déjà en cours de dégénérescence à en juger par ses contours irréguliers, est une cellule infectée par des rhizobia (Pl. VI, fig. 21 et 23).

Dans le même temps, des cellules situées dans la zone corticale plus profonde, sont stimulées et forment un méristème (ZM; Pl. V, fig. 20). Ce méristème est constitué par des cellules de petite taille, à paroi cellulaire mince. Leur noyau volumineux occupe une position centrale et leur cytoplasme, très dense, contient de nombreux plastes et vacuoles (Pl. VI, fig. 23 et 24).

Des coupes tangentielles du site de nodulation infecté, à un stade légèrement plus tardif, révèlent que la cellule infectée initiale est située dans le cortex externe du primordium racinaire (Pl. VII, fig. 25 et 26). Elle apparaît comprimée par les cellules environnantes et son contenu est fortement coloré. Observée au microscope électronique, cette cellule apparaît complètement dégénérée. Elle contient de très nombreux rhizobia inclus dans un matériel matriciel très dense aux électrons (Pl. VII, fig. 27). A ce stade de dégénérescence, aucun organite de la cellule hôte ne peut plus être distingué.

Il faut remarquer que l'infection a souvent plusieurs origines à l'intérieur d'un même site de nodulation (Pl. VIII, fig. 28 et 29). Nous décrirons plus loin le devenir de ces cellules infectées.

### 4. PROPAGATION DE L' INFECTION

Le développement subséquent de l'infection a lieu par la dégénérescence successive des cellules hôtes infectées. Les rhizobia envahissent les cellules selon un processus d'expansion non organisée de la paroi cellulaire (Pl. IX, fig. 30). Ils paraissent provenir de la paroi interne de la cellule hôte, dans laquelle ils sont parfois observés (Pl. IX, fig. 31 et 32). Au point de pénétration dans la cellule, les rhizobia sont inclus dans un matériel d'origine pariétale limité par une membrane en continuité avec la membrane plasmique (Pl. IX, fig. 30 et Pl. XI, fig. 34). Ces structures infectieuses ne dépassent jamais les limites de la cellule qu'elles infectent.

En outre, l'invasion cellulaire par les rhizobia a un effet néfaste sur la cellule infectée, son cytoplasme apparaît lâche et désorganisé et peu après, la cellule dégénère (Pl. X, fig. 33 et Pl. XI, fig. 34).

L'infection progresse de cellule à cellule. Les cellules adjacentes aux cellules en voie de dégénérescence sont à leur tour infectées selon le même processus d'expansion de la paroi cellulaire (Pl. XI, fig. 35). Dans la cellule en dégénérescence, des rhizobia et quelques constituants cellulaires encore reconnaissables baignent dans un matériel matriciel très dense (noyau, Pl. XII, fig. 36).

La progression de l'infection se déroule ainsi par la dégénérescence des cellules infectées. Le résultat final est l'obtention de traces infectieuses qui s'étendent depuis la cavité annulaire jusqu'à la zone méristématique en formation (Pl. XII, fig. 36, 37 et 38). A ce stade de l'infection, une assise de cellules à tanins se met en place tout autour de la zone méristématique (flèches, Pl. XII, fig. 36).

## 5. INFECTION DU MERISTEME NODULAIRE

La dégénérescence des cellules infectées cesse une fois la zone méristématique atteinte. Les cellules méristématiques, au voisinage des cellules en dégénérescence constituant la trace infectieuse, sont infectées par des rhizobia peu nombreux, pouvant se diviser à l'intérieur de leur membrane de séquestration (Pl. XIII, fig. 39).

Le mode d'infection des cellules méristématiques n'a pu clairement être mis en évidence. Cependant, des rhizobia dont la membrane de séquestration est en liaison avec la paroi de la cellule hôte sont fréquemment observés dans ces cellules (Pl. XIII, fig. 40 et 41).

Dans les cellules méristématiques, la présence de matériel matriciel d'origine pariétale enveloppant les rhizobia n'a jamais été observée. Les rhizobia sont simplement inclus dans une membrane pér bactéroidienne (Pl. XIII, fig. 39, 40 et 41; Pl. XIV, fig. 42 et 43).

## 6. DEVELOPPEMENT DU NODULE

La division successive des cellules infectées, associée à la prolifération des rhizobia, conduit à la croissance du volume du nodule (Pl. XV, fig. 44, 45 et 46). Dix à 12 jours après l'inoculation, la zone méristématique infectée s'est différenciée en un tissu central entouré par quelques couches de cellules périphériques contenant de grandes vacuoles et de très gros amyloplastés (Pl. XV, fig. 46).

Les rhizobia contenus dans les cellules du tissu central ont une forme allongée, peu différente de celle des mêmes rhizobia à l'état libre (Pl. XV, fig. 47). Cependant, dans leur état différencié de bactéroïde, leur nucléoïde apparaît compact, très dense aux électrons. En utilisant la méthode de fixation de Ryter et Kellenberger (1958), qui produit un minimum de coagulation de l'ADN, le nucléoïde apparaît sous une forme d'agrégats de fibres (Pl. XVI, fig. 48 et 49).

La nature nucléaire des fibres a été vérifiée par des techniques cytochimiques spécifiques. Par action combinée de la pronase et de la DNase, l'ADN et les protéines qui lui sont associées disparaissent progressivement, laissant apparaître des granules de polyphosphates (Pl. XVI, fig. 50 et 51). Si l'on fait agir l'EDTA sur les coupes, l'hétérochromatine et les granules perdent tout contraste, seuls les ribosomes restent contrastés (Pl. XVI, fig. 52).

Aucune cellule non infectée n'a été observée dans le tissu central du nodule mature.

Des sections longitudinales ou transversales effectuées dans des nodules âgés de 10 à 15 jours, déjà efficients, montrent des zones séparées de tissu infecté (fig. Pl. XVII, 53, 54, 55 et

57). L'existence de zones distinctes de tissu infecté signifie que l'infection a été initiée en autant d'origines différentes dans le site de nodulation. Ces zones, en s'étendant, ont tendance à fusionner entre elles (Pl. XVII, fig. 55 et 57).

## 7. INFECTION SECONDAIRE DU SITE DE NODULATION

A côté des zones infectées principales qui forment l'essentiel du tissu central du nodule, on trouve également des zones infectées que l'on désigne comme secondaires par rapport aux précédentes (Pl. XVII, fig. 53, 56 et 57). Ces zones d'infection secondaire sont constituées par des cellules volumineuses, isolées ou en groupes, et entourées par plusieurs couches de cellules de très petite taille suivant une organisation régulière (Pl. XVIII, fig. 58). Mis à part leur contour régulier, elles ressemblent aux cellules infectées initiales. Comme elles, elles contiennent de très nombreux rhizobia (Pl. XVIII, fig. 59). Cependant, ces cellules ne présentent pas de signe de dégénérescence et les rhizobia qu'elles renferment sont inclus en grand nombre dans des membranes péribactéroïdiennes (Pl. XVIII, fig. 60 et 61).

Des coupes à main levée, effectuées dans des nodules âgés de plus de 20 jours, montrent, d'une part que ces zones sont toujours présentes dans le cortex externe du nodule et d'autre part, qu'elles renferment le pigment rouge dû à la présence de lèghémoglobine, caractéristique de l'activité fixatrice d'azote des rhizobia contenus dans ces cellules.

## 8. DISCUSSION

Le processus d'infection qui conduit à la formation de nodules fixateurs d'azote sur les tiges d'*A. afraspera* présente beaucoup d'analogies avec celui décrit chez *Arachis* et *Stylosanthes* (Chandler, 1978; Chandler *et al.*, 1982), plantes tropicales chez lesquelles l'infection est directement intercellulaire et ne fait pas intervenir de cordons d'infection (voir synthèse bibliographique, chapitre I). L'une des caractéristiques principales des nodules ainsi formés est l'absence de cellules non infectées dans le tissu central de ces nodules.

L'infection des tiges d'*A. afraspera* a lieu au niveau de tissus lésés au point d'émergence d'une ébauche racinaire adventive. Ce mode d'infection par "blessure" ("wound" ou "crack entry", en anglais), intervient également chez *Sesbania rostrata* et constitue, plus généralement, la voie empruntée par de nombreux micro-organismes phytopathogènes.

Après une phase de multiplication des rhizobia dans les espaces intercellulaires ou dans des cellules aux parois ouvertes, l'infection devient intracellulaire selon un processus que nous ne sommes pas en mesure de préciser, étant donné la difficulté à saisir expérimentalement cette étape. La cellule infectée initiale est clairement localisée dans le cortex externe du primordium racinaire. A ce stade, les cellules corticales internes situées au dessous de la cellule infectée sont spécifiquement stimulées. La zone méristématique induite est, elle, localisée dans les tissus corticaux assurant la jonction entre la tige et l'ébauche racinaire.

L'induction à distance d'un processus organogénétique par les rhizobia a été décrite à la fois chez les légumineuses infectées par l'intermédiaire des poils absorbants (Libbenga et Harkes, 1973; Truchet *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1984) et chez la légumineuse à nodules caulinaires *Sesbania rostrata* (Tsien *et al.*, 1983; Duhoux, 1984). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse de Nutman (1965) selon laquelle les nodules apparaissent seulement aux endroits où se développe une activité méristématique.

Le développement subséquent de l'infection qui se manifeste par l'hypertrophie et la dégénérescence des cellules infectées, la synthèse de matériel pariétal au point d'entrée des bactéries dans les cellules, ressemble plus à une réaction de défense de la plante vis-à-vis d'un phytopathogène plutôt qu'à une relation symbiotique (Tarr, 1972; Aiste, 1977). La

dégénérescence des cellules infectées se poursuit jusqu'à ce que l'infection ait atteint la zone méristématique en formation. C'est seulement là que s'établit une relation symbiotique vraie. Une question peut alors être posée: Pourquoi la plante, qui jusque là réagissait à l'infection par les rhizobia comme elle l'aurait fait vis-à-vis de pathogènes, devient-elle plus "coopérative" et permet-elle alors l'établissement d'une vraie relation symbiotique?

Chez *A. afraspera*, le méristème nodulaire est ceinturé par un cordon de cellules contenant des composés phénoliques (tanins). De telles cellules sont aussi présentes dans les nodules de *Parasponia rigida* (Lancelle et Torrey, 1985) et dans beaucoup de nodules de plantes actynorhiziennes (Newcomb *et al.*, 1978). La fonction de ces cellules n'est pas connue; cependant, elles pourraient jouer un rôle de protection vis-à-vis de l'oxygène et vis-à-vis de l'infection secondaire par d'autres bactéries ou champignons (Newcomb *et al.*, 1978).

Le mode d'infection du méristème nodulaire par les rhizobia contenus dans les cellules dégénérées constituant la trace infectieuse n'a pu être établi. Toutefois, la présence de rhizobia isolés dans les parois cellulaires et de rhizobia dont la membrane de séquestration paraît en continuité avec la membrane plasmique laisse supposer que les rhizobia pourraient être capables de se déplacer à l'intérieur des parois cellulaires. Cette hypothèse, si elle était vérifiée, permettrait en outre d'expliquer pourquoi aucune cellule non infectée issue du méristème n'est retrouvée dans le tissu central du nodule.

La croissance du nodule s'effectue par mitoses successives des cellules infectées. Le résultat final est l'obtention d'un tissu central uniformément infecté.

Une donnée d'importance taxonomique concerne le nucléoïde des rhizobia à l'état de bactéroïdes (Gourret, 1974, 1978). Celui-ci peut être diffus dans le cas des rhizobia à croissance rapide (*R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*) ou bien compact, dense aux électrons et accompagné de granules de polyphosphates dans le cas des rhizobia à croissance lente (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. du cowpea ou du Lupin). D'après la condensation de leur matériel génétique, les rhizobia d'*A. afraspera* se rangent dans le groupe des *Bradyrhizobia* ou rhizobia à croissance lente.

La présence de très grandes cellules infectées d'un autre type que celles observées dans le tissu central du nodule, a été interprétée comme le résultat d'une surinfection du site par les rhizobia. Ces cellules sont semblables morphologiquement aux premières cellules infectées et leur localisation est identique; cependant, elles ne montrent aucun signe de dégénérescence. Une des hypothèses pouvant expliquer l'existence de ces structures est que la présence d'un méristème déjà infecté empêcherait le développement normal des infections initiées plus tardivement. La protection du méristème pourrait être assurée par l'enveloppe de cellules contenant des tanins décrite précédemment qui, outre son rôle protecteur vis-à-vis de l'oxygène, bloquerait la progression des infections secondaires.

Les nodules présents sur les tiges d'*A. afraspera* sont des nodules du type aeschynoménoïde selon la terminologie définie par Corby (1981). Ces nodules sont caractérisés par leur localisation à l'aisselle d'une racine latérale adventive et par une organisation interne particulière, dans le sens où aucune cellule non infectée n'est observée dans le tissu central des nodules. Les nodules du type aeschynoménoïde ont été décrits chez les membres de la tribu *Aeschynomeneae* mais aussi chez de nombreux membres de la tribu *Dalbergieae* et chez le genre unique constituant la tribu *Adesmieae* (Faria *et al.*, 1984; Sprent, 1989). L'intérêt taxonomique de ces observations est que toutes ces espèces qui ont une organisation interne identique de leurs nodules pourraient également partager le même mode d'infection, puisque le processus d'infection mis en évidence chez les genres *Aeschynomene*, *Arachis* et *Strylosanthes*, tous membres de la tribu *Aeschynomeneae*, est similaire. Ainsi, l'infection des légumineuses selon un processus différent de celui faisant intervenir les poils absorbants et les cordons d'infection pourrait être relativement courant dans la nature, en

particulier dans certaines tribus de légumineuses d'origine tropicale qui, jusqu'à présent, n'ont été que peu étudiées.

Remarquons, pour conclure, qu'*A. afraspera* et probablement les autres Aeschynomènes, chez lesquelles le développement des nodules s'effectue par simple division des cellules infectées, pourraient constituer un matériel de choix pour l'étude de la symbiose *in vitro*. Par l'intermédiaire de protoplastes, de cals infectés ou de cellules du tissu central infecté mises en culture (Duhoux et Alazard, 1983), il est permis d'espérer pouvoir élucider certains des facteurs qui contrôlent la symbiose et le processus de fixation d'azote *in vivo*.

## CHAPITRE VI : FIXATION D' AZOTE *IN VITRO* PAR LES RHIZOBIA D' *AESCHYNOMENE*

### 1. INTRODUCTION

On a longtemps cru que la synthèse de la nitrogénase et la fixation de l'azote par les rhizobia ne pouvaient avoir lieu qu'en présence de la plante hôte. En 1975, plusieurs laboratoires mirent simultanément en évidence la capacité de fixation de l'azote par certaines souche de rhizobia à croissance lente cultivées sur un milieu synthétique (Pagan *et al.*, 1975; Mc Comb *et al.*, 1975; Kurz et La Rue, 1975; Keister, 1975; Tjepkema et Evans, 1975). Ces travaux apportèrent ainsi la preuve définitive de la présence, dans le génome des rhizobia, de la totalité de l'information génétique nécessaire à la synthèse de la nitrogénase. Les nombreuses expériences d'induction de l'activité nitrogénase qui ont été menées par la suite ont permis de définir les conditions physiologiques optimales permettant la fixation d'azote non symbiotique. La faible concentration en azote combiné, la présence de plus d'une source de carbone (un pentose et un acide du cycle de Krebs) et des conditions de culture microaérobies sont des facteurs déterminants pour l'induction de la nitrogénase *in vitro* (Gibson *et al.*, 1976; Ranga Rao *et al.*, 1982). Bien que la capacité à fixer l'azote en culture soit souvent considérée comme une propriété du seul genre *Bradyrhizobium* (Agarwal et Keister, 1983; Kaneshiro *et al.*, 1978; Pankhurst *et al.*, 1982; Shindu et Dardawal, 1986), une activité fixatrice potentielle a été mise en évidence chez quelques souches de rhizobia à croissance rapide. Ces souches sont les suivantes: *Rhizobium leguminosarum* (Kurz et La Rue, 1975; Keister, 1975; Stam *et al.*, 1983), *R. meliloti* (Bedmar et Olivares, 1979), la souche de *Rhizobium cowpea* IHP100 isolée de *Cajanus cajan* (Bender *et al.*, 1986), la souche ANU289 isolée de *Parasponia* (Mohapatra *et al.*, 1983) et une souche de *R. trifolii* 0403 (Urban *et al.*, 1986). Cependant, à l'exception de la souche IHP100, l'activité nitrogénase spécifique des *Rhizobium* est assez faible puisqu'elle reste en général inférieure à 10 nanomoles de  $C_2H_4$  formé par heure et par mg de protéines, alors que les souches de *Bradyrhizobium* 32H1 ou CB756 peuvent en produire jusqu'à 500 nanomoles.

L'induction de l'activité nitrogénase *in vitro* chez toutes les souches de rhizobia testées à ce jour, nécessite la présence d'une source d'azote combiné et une faible tension en oxygène dissous dans le milieu de culture. En outre, la plus grande partie de l'azote fixé par les rhizobia est excrétée dans le milieu de culture sous la forme d'ions ammonium (O'Gara et Shanmugan, 1976). Ainsi, comme *in planta* où l'azote fixé par les bactéroïdes est excrété dans le cytosol des cellules infectées (Bergersen et Turner, 1967), l'assimilation de l'ammonium par les rhizobia à l'état libre apparaît découplée de la fixation de l'azote. A l'exception de la souche de *R. trifolii* 0403, qui après avoir subi un traitement préalable avec du succinate à forte concentration (16 mM) de telle sorte qu'elle devient morphologiquement et physiologiquement semblable aux bactéroïdes présents dans les nodules de Trèfle (Urban *et al.*, 1986). Aucune des souches de rhizobia citées ci-dessus n'est capable d'utiliser l'azote moléculaire comme seule source d'azote pour sa croissance.

Les rhizobia isolés des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* sont, à notre connaissance, les seuls capables d'exprimer en culture une activité réductrice d'acétylène très élevée (supérieure à 40 nmoles de  $C_2H_4$  produites/min./mg de protéines) et les seuls à pouvoir utiliser, d'une manière naturelle, les produits de la fixation comme seule source d'azote pour leur croissance (Dreyfus *et al.*, 1983; Gebhardt *et al.*, 1984). Ces rhizobia, dont la souche type est la souche ORS571, forment à présent un genre nouveau parmi les Rhizobiacées: *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988).

Les résultats présentés dans ce chapitre, montrent que la capacité de réduction de l'acétylène est une propriété commune chez de nombreuses souches de rhizobium isolées de diverses *Aeschynomènes*. De plus, certaines de ces souches paraissent capables d'utiliser l'azote fixé comme seule source d'azote pour leur croissance (Alazard, 1990).

## 2. RESULTATS

### 2. 1 Activité nitrogénase des rhizobia d'*Aeschynomene* cultivés en milieu faiblement gélosé

La méthode de culture en milieu faiblement gélosé utilisée pour la mise en évidence de l'activité réductrice d'acétylène des rhizobia est dérivée de la méthode décrite par Döbereiner et Day (1976) pour l'étude des Spirilles fixateurs d'azote. L'agar faiblement gélosé crée, dans le tube de culture, un gradient d'oxygène décroissant qui permet la croissance des bactéries nécessitant des conditions microaérophiles de culture. Dix neuf souches de rhizobia isolées de nodules caulinaires ou racinaires de différentes espèces d'*Aeschynomene* appartenant aux trois groupes d'inoculation croisée définis au chapitre III, ont été testées pour leur capacité à réduire l'acétylène. Les souches ORS571 et CB756 ont été utilisées en tant que souches de référence. Sur les milieux dépourvus d'azote, les cultures se développent sous la forme d'une mince couche de cellules situées à quelques millimètres au dessous de la surface de l'agar. Les souches d'*Aeschynomene* paraissent plus sensibles à l'oxygène que la souche ORS571, à en juger par la plus grande profondeur à laquelle elles se développent. Lorsque le milieu de culture contient du glutamate comme source d'azote (3 mM), toutes les cultures se développent à la surface du milieu gélosé ou à son proche voisinage. Le tableau 13 montre que les souches isolées d'*A. afraspera* et celles isolées des plantes du groupe d'inoculation III, dont l'espèce type est *A. indica*, sont toutes capables de réduire l'acétylène en culture. L'activité nitrogénase de ces souches varie entre 50 et 100 % de celle exprimée par la souche ORS571 dans les mêmes conditions de culture.

Mise à part la souche ORS304 isolée des nodules du collet d'*A. elaphroxylon*, les souches isolées des plantes du groupe d'inoculation croisée I, comme la souche CB756, sont incapables de se développer en milieu dépourvu de glutamate. De plus, l'activité nitrogénase exprimée par ces souches en présence de glutamate est soit nulle, soit très faible.

Les rhizobia d'*Aeschynomene*, dont le temps de génération est compris entre 4,2 et 8,5 h lorsqu'ils sont cultivés sur le milieu YM à 30 °C, doivent être considérés comme des rhizobia à croissance rapide ou intermédiaire (tableau 13).

Les cinétiques de la production d'éthylène par les souches de rhizobia ORS322 et ORS310, représentatives de chacun des deux groupes d'inoculation croisée II et III, ont été comparées avec celles obtenues avec les souches de référence ORS571 et CB756 (figure 3 A et

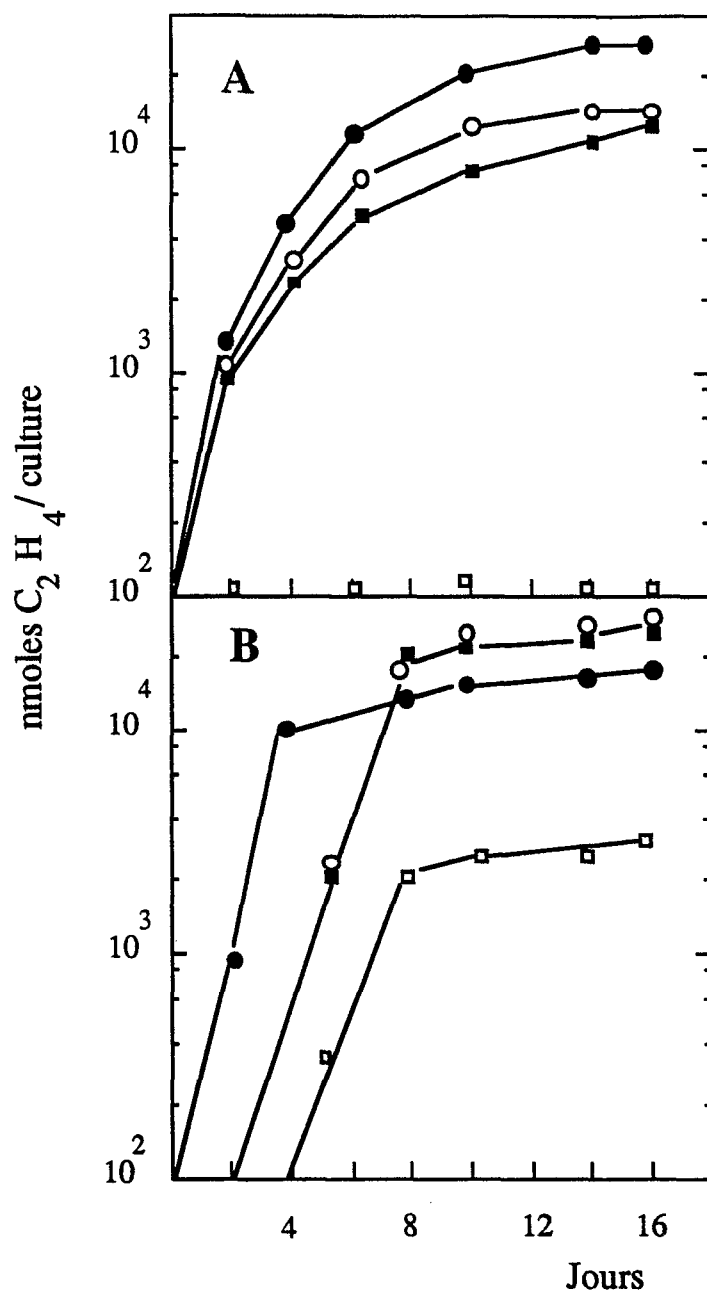


Souches	Plante d'isolement	Groupe d'inoculation croisée des plantes hôtes	Temps de génération (h)	Activité nitrogénase <i>ex planta</i> après 7 jours de culture (μmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / culture)	
				- glutamate	+ glutamate
ORS571	<i>Sesbania rostrata</i> (T <sup>a</sup> )	-	5,5	11,0	20,0
ORS303	<i>A. afraspera</i> (T)	2	5,5	8,5	4,5
ORS308	<i>A. afraspera</i> (R)	2	5,0	10,5	5,0
ORS312	<i>A. afraspera</i> (R)	2	4,8	9,0	18,5
ORS322	<i>A. afraspera</i> (T)	2	4,8	8,0	20,0
ORS326	<i>A. afraspera</i> (T)	2	5,7	5,5	8,0
ORS337	<i>A. afraspera</i> (T)	2	5,2	5,7	11,0
ORS306	<i>A. indica</i> (T)	3	7,5	4,0	7,0
ORS310	<i>A. indica</i> (T)	3	6,5	9,5	18,0
ORS318	<i>A. indica</i> subsp1 (T)	3	7,8	5,0	4,1
ORS319	<i>A. indica</i> subsp1 (T)	3	7,5	8,0	16,0
ORS320	<i>A. indica</i> (T)	3	4,5	5,0	15,5
ORS328	<i>A. indica</i> subsp2 (T)	3	5,2	8,5	14,0
ORS330	<i>A. sensitiva</i> (T)	3	5,8	6,0	13,0
ORS334	<i>A. tambacoundensis</i> (T)	3	4,2	7,5	10,0
ORS301	<i>A. americana</i> (R)	1	6,0	0,0	0,0
ORS302	<i>A. pfundii</i> (T <sup>b</sup> )	1	8,5	0,0	0,0
ORS304	<i>A. elaphroxylon</i> (T <sup>b</sup> )	1	5,0	7,0	12,0
ORS305	<i>A. schimperi</i> (R)	1	7,5	0,0	0,2
ORS309	<i>A. uniflora</i> (T)	1	8,0	0,0	0,0
CB756	<i>Macrotyloma africanum</i>	1	14,0	0,0	2,0

<sup>a</sup>T, souche isolée de nodule de tige; R, souche isolée de nodule de racine.

<sup>b</sup> nodules caulinares limités à la partie basse et immergée de la tige.

**Tableau 13:** Caractéristiques et activité nitrogénase *ex planta* des rhizobia d'*Aeschynomene* après 7 jours de culture en milieu gélosé semi-solide.  
Les valeurs sont la moyenne de 4 répétitions.



**Figure 3:** Cinétique de l'activité nitrogénase d'*Azorhizobium caulinodans* ORS571 (●), des rhizobia d'*Aeschynomene* ORS310 (■) et ORS322 (○), de la souche CB756 (□) cultivés en milieu faiblement gélosé en absence (A) en présence (B) de 3 mM de glutamate

B). En absence d'une source d'azote, les cinétiques obtenues avec les souches ORS310 et ORS322 sont semblables à celle obtenue avec ORS571, et aucune activité n'est détectable avec la souche CB756. En présence de glutamate, une phase de latence de 2 jours est observée avant l'apparition de l'activité nitrogénase dans les tubes de culture pour les souches d'*Aeschynomene* (figure 3 B). La phase de latence est de 7 jours dans le cas de la souche CB756. De plus, la production d'éthylène par cette dernière souche est 10 fois plus faible que celle obtenue avec les autres souches.

La croissance des souches en milieu semi-solide, bien que nettement visible, n'a pu être confirmée par le dosage des protéines totales à cause des interférences dues à la présence de l'arabinose et de la gélose.

## 2. 2 Activité nitrogénase et croissance des rhizobia d'*Aeschynomene* cultivés en milieu liquide en absence d'azote combiné

L'activité nitrogénase des souches de rhizobia d'*Aeschynomene* cultivées en milieu liquide sans azote est maximale lorsque la tension d'oxygène dans la phase gazeuse des flacons de culture est 0,5 % (résultats non présentés). La souche ORS571 a été cultivée en présence de 3 % d'oxygène, ce qui correspond à la tension d'oxygène optimale pour cette souche (Dreyfus *et al.*, 1983).

La cinétique de la production d'éthylène par les souches ORS571, ORS310 et ORS322 en cultures liquides agitées est présentée sur la figure 4. Les 3 souches testées ont une activité nitrogénase quasi identique et le niveau d'activité obtenu est d'environ  $5 \times 10^4$  nmoles de  $C_2H_4$  par flacon après 4 jours de culture.

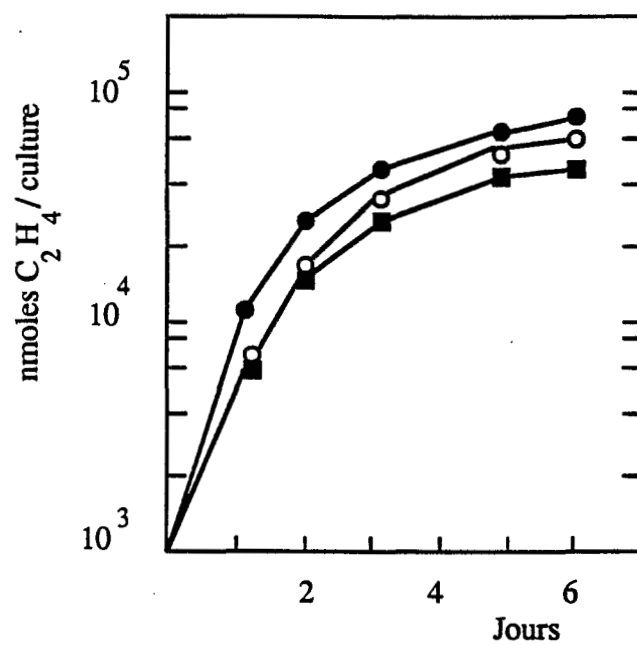
La croissance des souches cultivées en milieu liquide a pu être estimée par le dosage des protéines totales après centrifugation des cultures. Ce traitement permet d'éliminer les interférences, dans le dosage, dues à la présence de l'arabinose dans le milieu de culture. La teneur en protéines des cultures augmente de 10 à 100  $\mu$ g de protéines par ml après 6 jours de culture (tableau 14).

Ainsi, mises à part les très faibles quantités d'azote combiné apportées par les vitamines, c'est l'azote fixé en culture sous de faibles tensions d'oxygène qui permet la croissance des souches ORS310 et ORS322.

## 3. DISCUSSION

Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que les rhizobia isolés d'*Aeschynomene afraspera* et des Aeschynomènes du groupe d'inoculation croisé III - dont l'espèce type est *A. indica* - possèdent une activité nitrogénase *in vitro* élevée. L'activité de ces souches est du même ordre de grandeur que celle exprimée par la souche *A. caulinodans* ORS571 dans les mêmes conditions de culture, et nettement supérieure à celle de la souche *Bradyrhizobium* sp. CB756 du groupe cowpea. De plus, comme *A. caulinodans* et les autres fixateurs libres, la fixation de l'azote par les rhizobia d'*Aeschynomene* ne nécessite pas la présence d'une source d'azote combiné dans le milieu de culture.

Les rhizobia d'*Aeschynomene* fixateurs d'azote en culture pure et les souches d'*Azorhizobium* ont en commun la propriété de noduler les tiges de légumineuses aquatiques tropicales. Ainsi, la capacité qu'ont ces rhizobia de croître en utilisant l'azote moléculaire comme seule source d'azote pourrait être corrélée à leur aptitude à noduler les tiges de leur plante hôte.



**Figure 4:** Cinétique de l'activité nitrogénase d'*Azorhizobium caulinodans* ORS571 (■) et des rhizobia d'*Aeschynomene* ORS310 (●) et ORS322 (○) cultivés en milieu liquide en absence d'azote combiné

Souches	Activité nitrogénase	Croissance
	$\mu\text{moles C}_2\text{H}_4$ / mg de protéines	$\mu\text{g}$ de protéines / ml
ORS571	29,7	130
ORS310	26,6	95
ORS322	28,5	105

**Tableau 14:** Activité nitrogénase et estimation de la croissance des souches ORS310, ORS322, et ORS571 après 6 jours de culture.  
Tension d'oxygène dans la phase gazeuse: 0,5 % pour les souches ORS310 et ORS322, et 3 % pour la souche ORS571.

La confirmation d'une parenté de ces souches au niveau moléculaire a été obtenue récemment par Kaminski *et al.* (1988). Ces auteurs ont mis en évidence chez *A. caulinodans* ORS571 la présence d'un gène nouveau (*nif* O), impliqué à la fois dans le processus de fixation symbiotique de l'azote et dans celui de la fixation à l'état libre de cette bactérie. Par des expériences d'hybridation, ils ont trouvé une très forte homologie entre une sonde *nif* O et l'ADN total de la souche ORS322. En revanche, aucune homologie n'a pu être trouvée ni avec des souches de *Bradyrhizobium*, ni avec d'autres souches de *Rhizobium* typiques.

La propriété de certains rhizobia d'*Aeschynomene* de se développer en utilisant l'azote moléculaire comme seule source d'azote pose le problème de la position taxonomique de ces rhizobia à croissance rapide parmi les autres Rhizobiacées.

## CHAPITRE VII : ETUDE TAXONOMIQUE DES RHIZOBIA D'*AESCHYNOMENE*

### 1. INTRODUCTION

La classification actuelle des Rhizobiacées, telle que nous l'avons présentée dans la synthèse bibliographique au début de ce mémoire, reconnaît trois genres de rhizobia: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*.

La position taxonomique des rhizobia isolés de nodules caulinaires des plantes appartenant au genre *Aeschynomene* n'a, à ce jour, pas été clairement définie. Les rhizobia associés aux Aeschynomènes à nodulation exclusivement racinaire sont généralement classés parmi les rhizobia à croissance lente (*Bradyrhizobia*) du groupe cowpea (Date et Halliday, 1980; Allen et Allen, 1981). Les seules données de la littérature concernant des rhizobia isolés de nodules caulinaires d'*Aeschynomene* sont les travaux de Stowers et Eaglesham (1983) et ceux de Chakrabarti *et al.* (1986). Les premiers auteurs ont montré que la souche BTAi1 isolée d'*A. indica* possédait des caractéristiques phénotypiques à la fois des *Rhizobium* et des *Bradyrhizobium* typiques. Les seconds, n'ayant trouvé aucune homologie entre l'ADN de la souche BICC806 isolée de nodules de tige d'*A. aspera* et les ADN de différentes souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*, ont suggéré que les rhizobia d'*Aeschynomene* pourraient constituer une espèce nouvelle de rhizobia à croissance rapide.

La mise en évidence de l'aptitude de nombreuses souches de rhizobia d'*Aeschynomene* à fixer l'azote *in vitro*, propriété jusqu'ici caractéristique des *Azorhizobium*, nous a naturellement conduit à désirer préciser la position taxonomique de ces rhizobia parmi les autres Rhizobiacées. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le laboratoire de Microbiologie et de Génétique (LMG) du professeur K. KERSTERS (Université de Gand, Belgique).

### 2. RESULTATS

#### 2.1 Analyse numérique des caractères phénotypiques

L'étude a été effectuée avec les souches présentées sur les tableaux 3 et 4, c'est-à-dire avec 33 souches isolées de nodules caulinaires ou racinaires de différentes Aeschynomènes, 26 souches de *Rhizobium* typiques, 6 souches d'*Azorhizobium*, 21 souches de *Bradyrhizobium*, 1 souche d'*Agrobacterium*, 2 souches de *Xanthobacter* et 2 souches de *Phyllobacterium*.

Cette étude a porté sur 148 caractères morphologiques, physiologiques et nutritionnels. Un certain nombre de caractères non discriminants car identiques (négatifs ou positifs) pour toutes les souches, ont été exclus de la matrice finale. Ces 44 caractères sont les suivants: coloration de Gram, mensurations des bactéries, présence de l'oxydase, de la catalase, production de di-OH-acétone, hydrolyse de l'amidon, de la gélatine, du Tween 80, du jaune d'oeuf, d'indole, d'H<sub>2</sub>S, recherche de la tryptophane désaminase, production de 3-kéto-lactose -spécifique d'*Agrobacterium tumefaciens*-, croissance sur KNO<sub>3</sub> 8%, KNO<sub>2</sub> 0,5 %, à 4 °C, à 35 °C, à pH 6, utilisation comme source de carbone et d'énergie des composés tels que l'amidon, le propionate, le butyrate, l'iso-butyrate, le valérate, l'iso-valérate, le palmitate, le

caproate, le caprate, le p  largonate, le pim  late, le sub  rate, le DL  $\alpha$ -OH-butyrate, le m  saconate, le tartronate, le D-tartrate, le benzoate, la L-leucine, la L-cystéine, la DL-sérine, la DL-thréonine, la L-méthionine, le DL-tryptophane, l'histamine, l'esculine, le n-dodécane et le n-h  xad  cane. Certains tests ont montré une grande spécificité: l'inuline et le glycolate ne sont utilisés comme source de carbone que par les seuls *Xanthobacter* et la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* est la seule à n'utiliser ni le lactate ni le pyruvate. La liste des caractères discriminants pour la distinction parmi les rhizobia (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*) est reportée sur le tableau 15.

La représentation graphique de l'analyse numérique de ces résultats selon un dendrogramme (figure 5) ou une matrice ombragée (figure 6), en utilisant le coefficient d'association de Sokal et Michener (1958), a permis, d'une part à confirmer le groupement des souches selon le genre auquel elles appartiennent (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Xanthobacter* et *Phyllobacterium*), et d'autre part à mettre en évidence l'existence de 2 groupes de souches dans le genre *Bradyrhizobium*.

Bien que la majorité des rhizobia isolés d'Aeschynomènes soient des rhizobia à croissance rapide, ils sont tous distribués dans les 2 groupes de souches du genre *Bradyrhizobium*. Le premier groupe (*Bradyrhizobium* sp.) comprend les souches de *Bradyrhizobium* de référence et les rhizobia d'Aeschynomènes qui ne fixent pas l'azote en culture libre tandis que le phénon A, défini au seuil de similitude de 85 %, est constitué par l'ensemble des souches d'Aeschynomènes capables de fixer l'azote *in vitro* (partie hachurée du dendrogramme de la figure 5).

Une des caractéristiques remarquables des souches d'*Aeschynomene* capables de fixer l'azote en culture est que la majorité d'entre elles présentent une pigmentation rose après une dizaine de jours de culture sur le milieu YM. Cette pigmentation est encore accentuée lorsque les cultures en boîtes de Pétri sont laissées à la lumière du jour.

La plupart des souches constituant le phénon A réduisent le nitrate en nitrite. Cependant, comme les *Azorhizobium*, ces souches ne d  nitrifient pas. Aucun caractère nutritionnel ne permet véritablement de différencier les souches du phénon A des autres bradyrhizobia, excepté une utilisation plus généralisée des acides organiques.

On peut noter que toutes les souches fixatrices d'azote en culture ainsi que la majorité des souches de *Bradyrhizobium* sont tolérantes aux conditions acides de culture (pH 4,5), conditions que l'on rencontre souvent dans les sols tropicaux.

En ce qui concerne les *Azorhizobium*, ils se différencient des autres genres essentiellement par le fait qu'ils n'assimilent pas la plupart des disaccharides et les principaux polyalcools.

Les *Rhizobium* sont capables d'assimiler une grande variété de mono-, di-, et trisaccharides. Toutes les souches de *Rhizobium* utilisent le glutamate et le  $\alpha$ -aminobutyrate. La souche NGR234 isolée de *Lablab purpureus* est la seule parmi les *Rhizobium*    ne pas posséder d'uréase. Les souches de *Rhizobium* ORS609 et ORS611 isolées respectivement de nodules racinaires de *Sesbania cannabina* et de *S. grandiflora* sont, avec les souches de *Xanthobacter* et de *Phyllobacterium* les seules à utiliser l' $\alpha$ -alanine. Il n'est toutefois pas possible de distinguer les différentes espèces à l'intérieur du genre *Rhizobium*.

## 2. 2 Taxonomie moléculaire

Le tableau 16 donne le pourcentage en guanine + cytosine de 6 souches d'Aeschynomènes et l'hybridation de leur ADN avec l'ARN-r 23 s marqué au  $^{14}\text{C}$  de *Bradyrhizobium japonicum* NZP5549 (LMG6138).



Tableau 15

Caractères	<i>Rhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
			sp.	phénon A
Nombre de souches	26	7	31	22
<b>Caractères morphologiques</b>				
Ciliation (sub)polaire (m. solide)	3	0	100	100
péritriche	97	100	0	0
Diamètre des colonies < 2 mm	0	100	53	86
2 < d < 5 mm	51	0	40	14
d > 5 mm	49	0	7	0
Colonies punctiformes, circulaires, à marges entières	3	100	36	86
Colonies muqueuses ou liquides	97	0	64	14
Col. opaques, blanches ou crème	97	0	63	100
Colonies translucides	3	100	37	0
Col. rosées après 10 jours de culture	0	0	0	68
<b>Caractères physiologiques</b>				
Production d'acide / YM	100	0	0	0
Croissance rapide / YM	100	100	13	95
Fixation d'azote en culture	0	100	0	100
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	61	100	57	91
NO <sub>3</sub> → N <sub>2</sub>	45	0	30	0
Uréase	96	100	83	91
β-Galactosidase	73	0	16	9
Croissance sur le milieu de Simmons	30	100	53	68
NaCl 1 %	20	100	3	4
42 °C	57	100	10	72
pH 4,5	38	0	66	95
pH 9,0	92	100	100	100
<b>Assimilation des substrats carbonés</b>				
<b>- sucres et dérivés</b>				
D-Ribose	92	0	93	95
D-Xylose	100	0	100	100
L-Xylose	42	0	53	86
D-Arabinose	88	0	96	100
.../...				

Tableau 15 (suite)

Caractères	<i>Rhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
			sp.	phénon A
L-Arabinose	100	0	100	100
Raffinose	92	0	0	0
L-Rhamnose	100	14	3	13
D-Glucose	100	0	80	100
D-Mannose	100	0	80	100
D-Galactose	100	0	100	100
$\beta$ -D-Fructose	100	0	60	59
$\alpha$ -méthyl Glucoside	26	0	0	0
Saccharose	100	0	0	0
Tréhalose	100	0	3	0
Maltose	100	0	3	0
$\alpha$ -Cellobiose	100	0	0	0
Lactose	95	0	3	0
Gluconate	37	100	30	100
Saccharate	7	100	100	100
Mucate	4	100	100	100
Azélaïdate	0	100	13	91
<b>- acides gras</b>				
Acétate	8	100	0	0
<b>- acides dicarboxyliques</b>				
Oxalate	0	0	23	0
Malonate	22	100	46	77
Succinate	100	100	86	100
Fumarate	77	100	53	91
Glutarate	35	100	70	77
Adipate	3	100	43	95
Crotonate	0	0	3	0
Sébacate	0	0	50	0
2-oxo-Glutarate	44	100	80	100
<b>- hydroxyacides</b>				
D-Malate	61	100	46	100
.../...				

Tableau 15 (suite)

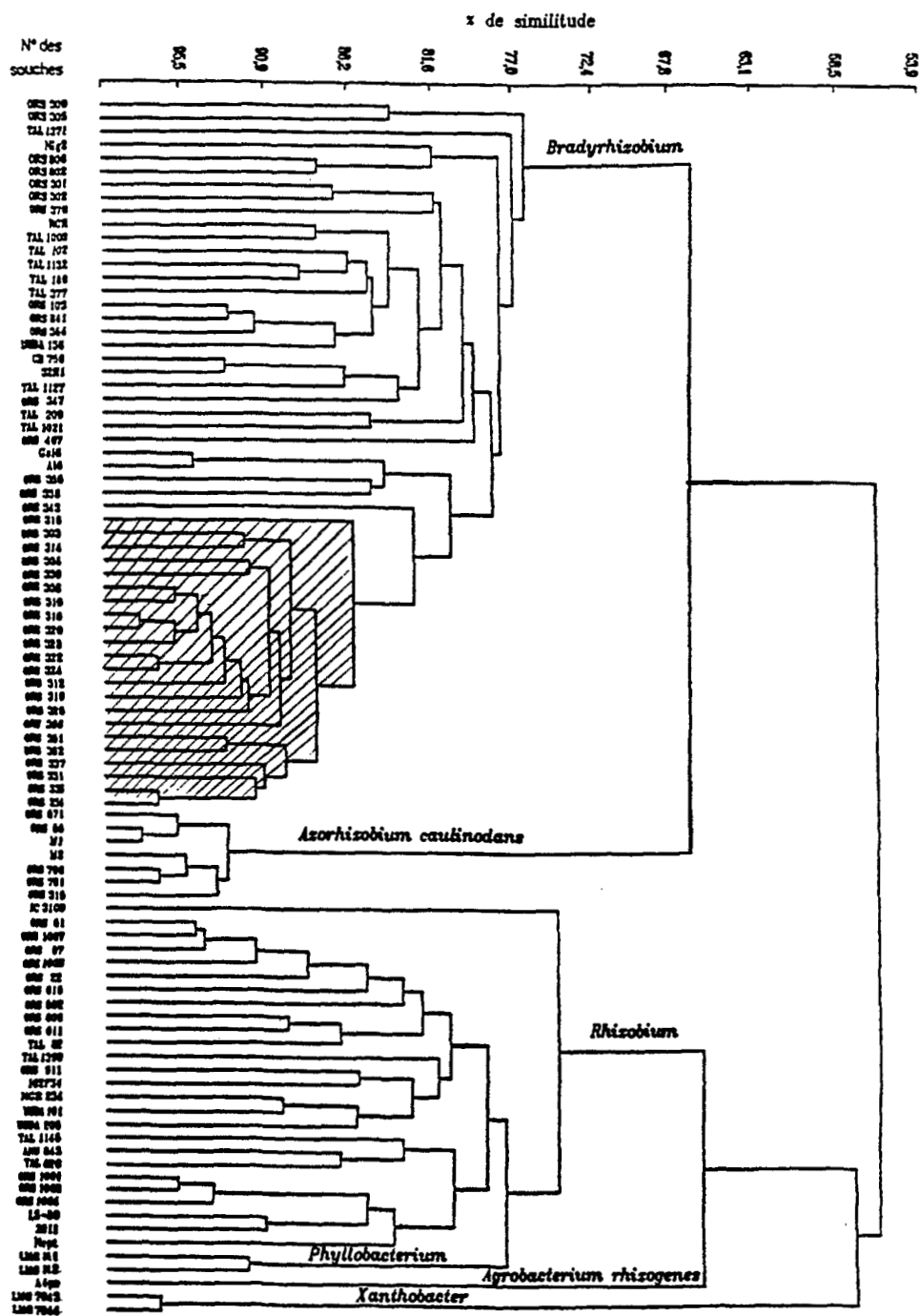
Caractères	<i>Rhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
			sp.	phénon A
DL-Malate	97	100	90	100
L-Tartrate	7	0	66	82
méso-Tartrate	0	0	33	27
DL-Glycérate	96	100	96	100
<b>- acides organiques divers</b>				
Citrate	48	100	70	100
Citraconate	3	100	83	59
Itaconate	0	14	60	77
Formate	0	0	3	0
D-Glucuronate	33	100	83	95
D-Galacturonate	48	100	90	100
trans-Aconitate	33	100	50	100
m-OH-Benzoate	0	0	16	41
p-OH-Benzoate	7	100	3	0
Quinate	64	100	70	77
<b>- polyalcools et glycols</b>				
Erythritol	30	0	10	0
Arabitol	44	0	23	77
Mannitol	97	0	93	100
Sorbitol	100	0	73	100
Inositol	100	0	7	0
Adonitol	92	0	60	72
Glycérol	88	100	73	100
Dulcitol	44	0	0	0
Propane 1, 2-diol	3	100	3	0
Butane 2, 3-diol	7	0	3	0
<b>- alcools</b>				
Ethanol	37	0	3	4
n-Propanol	19	28	13	18
n-Butanol	3	43	13	0

.../...

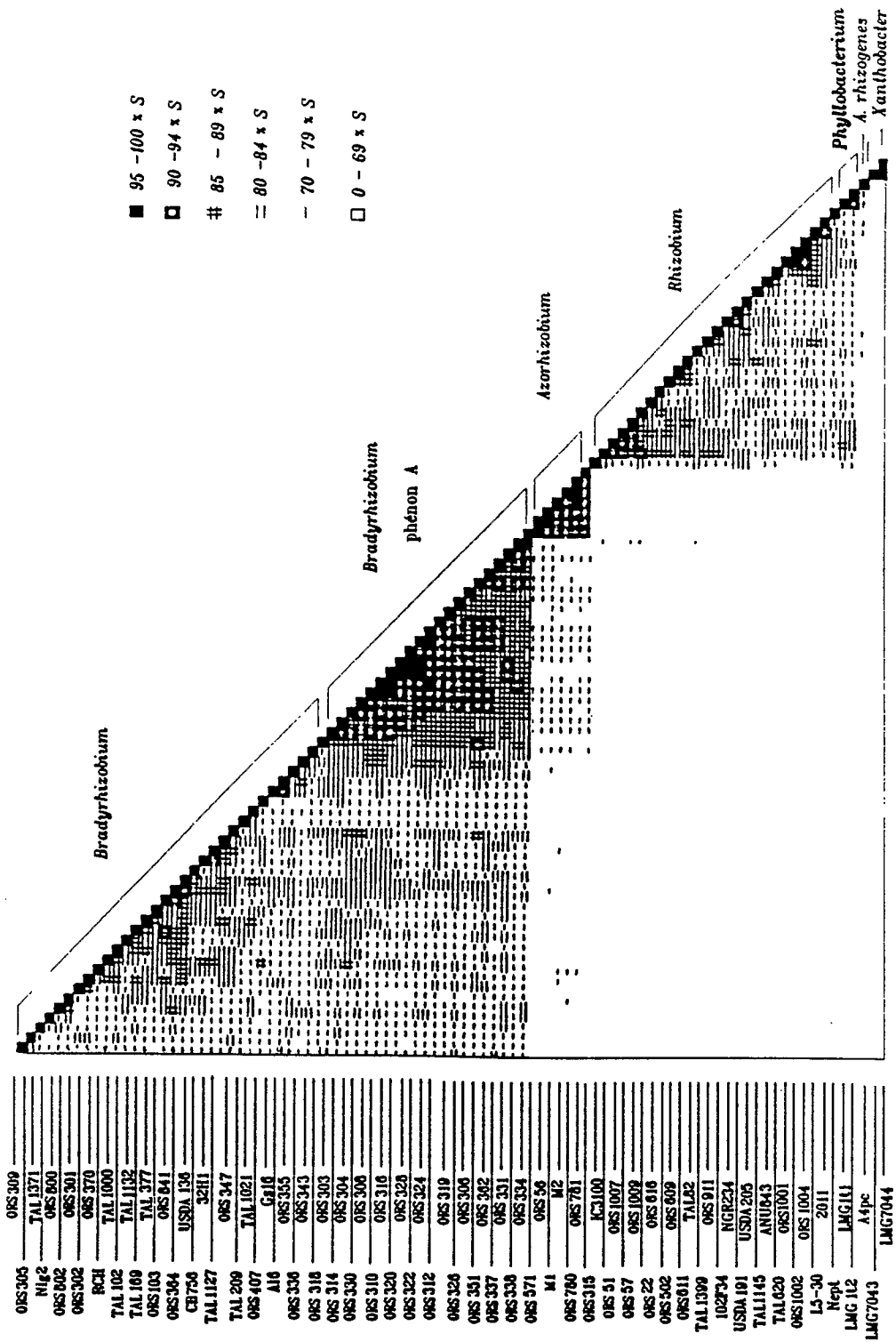
Tableau 15 (suite)

Caractères	<i>Rhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
			sp.	phénon A
<b>- acides aminés aliphatiques</b>				
DL- $\alpha$ -Alanine	7	0	0	0
$\beta$ -Alanine	78	0	20	0
L-Aspartate	15	28	53	50
L-Glutamate	100	100	43	63
L-Lysine	65	43	0	0
L-Arginine	73	0	0	0
DL-Ornithine	80	0	13	9
L-Histidine	85	0	3	0
L-Asparagine	54	0	20	0
$\alpha$ -amino-Butyrate	100	0	13	9
D-Glucosamine	19	0	3	0
Méthylamine	8	0	10	0
<b>- acides aminés aromatiques</b>				
DL-Proline	77	100	7	0
L-Phénylalanine	11	0	0	0
<b>- amines et divers</b>				
Bétaïne	81	0	3	0
Sarcosine	46	100	0	0
Hippurate	26	0	3	0
Acétamide	11	43	76	95

**Tableau 15 :** Principales caractéristiques permettant de différencier les souches de *Rhizobium*, d'*Azorhizobium* et de *Bradyrhizobium*.



**Figure 5 : Dendrogramme des souches de rhizobia basé sur les données de l'analyse des tests morphologiques, physiologiques et nutritionnels (voir tableau 15).**



**Figure 6 :** Représentation sous la forme d'une matrice ombragée des coefficients de similitude calculés à partir de l'analyse de taxonomie numérique.

ADN		Tm(e) en °C des hybrides ADN:ADN de:		
Souches	% G+ C	<i>B. japonicum</i> NZP5549 <sup>T</sup>	<i>A. caulinodans</i> ORS571 <sup>T</sup>	<i>R. meliloti</i> NZP4009
ORS301	65,5	80,9*	-	-
ORS304	58,9	80,5	-	-
ORS305	63,2	80,6	-	-
ORS306	65,1	78,5	-	-
ORS322	64,0	79,2	-	-
ORS324	65,6	78,5	-	-
ORS571	66,0	73,5	81,6	68,0
ORS51	-	-	-	77,8

\* Tm(e) est la température à laquelle 50% de l'hybride ont été dénaturés

**Tableau 16:** Composition en bases et hybridation de l'ADN des souches d'*Aeschynomene* avec l'ARN ribosomal marqué des souches de référence: { <sup>14</sup>C } ARN-r de *B. japonicum* NZP5549<sup>T</sup> (LMG6138), { <sup>3</sup>H } ARN-r d'*A. caulinodans* ORS571<sup>T</sup> et de *R. meliloti* NZP4009 (LMG6130).

La teneur en G + C pour les souches de rhizobia d'*Aeschynomènes* analysées est comprise entre 63 et 66 %, à l'exception de la souche ORS304 pour laquelle le GC % est de 58,9. Ces valeurs sont voisines de celles généralement obtenues pour les *Bradyrhizobium* (62,8 - 65,5 %) et légèrement inférieures à celles des *Azorhizobium* (66 - 68 %).

L'appartenance des souches d'*Aeschynomènes* à la branche phylogénique des *Bradyrhizobium* est confirmée par les valeurs élevées du Tm(e) des hybrides ADN: ARN-r obtenus entre l'ADN des rhizobia d'*Aeschynomene* et l'ARN marqué de *B. japonicum* NZP5549 (tableau 16).

### 3. DISCUSSION

L'étude des propriétés phénotypiques et génomiques des rhizobia d'*Aeschynomene* a permis d'apparenter ces rhizobia au genre *Bradyrhizobium*. Les rhizobia d'*Aeschynomene* capables de fixer l'azote en culture constituent un phénon homogène parmi les *Bradyrhizobium*.

Le même positionnement taxonomique a été établi par l'analyse des profils électrophorétiques des protéines cellulaires totales (De Leenheer, 1989). Cette dernière méthode, très discriminante puisqu'elle permet la mise en évidence des différentes espèces dans le genre *Rhizobium*, ne regroupe cependant pas les rhizobia fixateurs d'azote en culture pure isolés d'*Aeschynomene* en un phénon homogène parmi les *Bradyrhizobium*.

Cette classification est confirmée au niveau moléculaire à la fois par la teneur en G + C de l'ADN des souches et par les hybridations ADN : ARN ribosomal d'une souche de *B. japonicum* de référence. Ainsi, malgré des propriétés remarquables comme leur vitesse de croissance et surtout l'aptitude de certaines souches à fixer librement l'azote en culture en absence d'azote combiné, les rhizobia isolés des *Aeschynomènes* à nodules caulinaires sont des membres à part entière du genre *Bradyrhizobium*. La création d'une nouvelle espèce pour désigner les rhizobia fixateurs d'azote en culture (phénon A) nécessitera des études d'homologie entre l'ADN de ces souches et celui des *Bradyrhizobium* typiques ainsi que l'étude de la stabilité thermique des hybrides obtenus { $\Delta Tm(e)$ }

Le développement d'une pigmentation rosée par de nombreuses souches d'*Aeschynomene* capables de fixer l'azote en culture, est une propriété extrêmement rare parmi les rhizobia. A ce jour, cette propriété a seulement été décrite chez certaines souches de *B. japonicum* isolées de *Lotononis bainseii*, lesquelles possèdent d'autres caractéristiques uniques: (a) un G + C % (68-69 %) plus élevé que les autres bradyrhizobia et, (b) une absence de réaction avec les anti-sérums préparés contre les rhizobia à croissance rapide, et avec ceux préparés contre les rhizobia à croissance lente (Vincent, 1977).

Si l'on garde en mémoire que le genre *Bradyrhizobium* appartient à la branche ARN-r de *Rhodopseudomonas palustris* (voir synthèse bibliographique; Jarvis *et al.*, 1986; Woese, 1987), la coloration rosée des cultures de certains rhizobia d'*Aeschynomene* n'est pas sans rappeler celle observée chez *R. palustris* lorsque cette espèce, "bactérie pourpre" fixatrice d'azote et phototrophe en anaérobiose, est cultivée en aérobiose (Pfennig et Trüper, 1974). On peut dès lors imaginer que les souches présentant une coloration rosée puissent être capables de photosynthèse, supposition étayée par la mise en évidence récente d'une faible quantité de bactériochlorophylle *a* chez la souche de rhizobium BTA11 isolée des nodules caulinaires d'*A. indica* (Cornell University News, 1988; Eaglesham *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1990). Cette souche est cependant incapable de croître sur un milieu dépourvu d'une source de carbone, ou en conditions chimioautotrophes sous une atmosphère enrichie en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Cette souche, pour laquelle il est proposé de créer un nouveau genre *Photorhizobium* (Fleischman *et al.*, 1989), et sans aucun doute les souches d'*Aeschynomene* fixatrices d'azote en culture isolées



au cours de cette étude, pourraient constituer le maillon intermédiaire entre les bactéries pourpres phototrophes et fixatrices d'azote (Rhodospirillacées) et les *Bradyrhizobium*.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que le phénomène ait été observé et décrit il y a plus d'un demi-siècle, la symbiose à nodulation caulinaire est restée une curiosité naturelle jusqu'à ce que l'étude conduite chez la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* révèle les propriétés exceptionnelles de ce système fixateur d'azote. Cette étude a été le point de départ d'importantes recherches fondamentales de physiologie et de génétique moléculaire dans de très nombreux laboratoires en raison des propriétés uniques de son microsymbiote, *Azorhizobium caulinodans*. De plus, la mise en évidence du potentiel fixateur d'azote extrêmement élevé de la symbiose a conduit à développer, dans les centres de recherches internationaux d'Afrique et surtout d'Asie, des recherches appliquées visant à promouvoir l'utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert en riziculture.

L'objectif du travail présenté dans ce mémoire était la recherche et l'étude de légumineuses tropicales à nodules caulinaires, autres que *Sesbania rostrata*, présentes en Afrique de l'Ouest. Notre intérêt s'est porté sur les plantes appartenant au genre *Aeschynomene* qui, à la différence du genre *Sesbania*, comprend de nombreuses espèces capables de développer des nodules sur leur tige.

L'étude de la symbiose à nodulation caulinaire chez *Aeschynomene* nous a permis de confirmer le potentiel fixateur d'azote très élevé de ce type particulier de symbiose, de préciser les modalités de l'infection et du développement des nodules sur les tiges d'*Aeschynomene afraspera*, mais c'est l'étude des propriétés physiologiques des microsymbiotes qui s'est révélée, peut-être, la plus originale puisqu'elle a mis en évidence chez les rhizobia isolés de nodules caulinaires, l'aptitude à fixer librement l'azote atmosphérique en culture. Ces rhizobia, bien qu'ils appartiennent au genre *Bradyrhizobium* ont un comportement analogue à celui d'*Azorhizobium caulinodans* et des fixateurs libres.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'inventaire et à la classification des Aeschynomènes présentes en Afrique de l'Ouest. Nous avons dégagé de cette étude les espèces qui nous paraissaient les plus prometteuses sur le plan des applications agronomiques en raison de leur potentiel fixateur d'azote très élevé.

Nous avons pu recenser, au Sénégal, 10 espèces d'*Aeschynomene* qui, pendant la saison des pluies, poussent spontanément autour des mares temporaires. Parmi ces espèces, huit portent des nodules aériens, soit tout le long de leur tige, soit seulement au niveau du collet. Les nodules caulinaires apparaissent toujours en des sites prédéterminés, appelés sites de nodulation, correspondant au point d'émergence d'une ébauche racinaire adventive. Ces ébauches racinaires présentent un état de dormance qui peut facilement être levé par l'immersion dans l'eau de la tige des plantes.

En complétant notre collection d'Aeschynomènes avec 11 autres espèces provenant de la collection de l'IFAS (Université de Floride), nous avons pu mettre en évidence l'existence de 3 groupes d'inoculation croisée distincts à l'intérieur du genre *Aeschynomene*. Une espèce type pour chacun des 3 groupes a été définie: *A. elaphroxylon* (groupe d'inoculation croisée I), *A. afraspera* (groupe II) et *A. indica* (groupe III).

Nous avons également établi que chacun des groupes d'inoculation croisée est caractérisé par un type de structure anatomique du site de nodulation caulinaire qui lui est propre. Le site de nodulation des plantes du groupe II (*A. afraspera* et *A. nilotica*) présente la structure la plus évoluée. Il est constitué par un dôme épidermique proéminent et un primordium racinaire dont l'apex est simplement recouvert par une couche de cellules

épidermiques aplaties. Une cavité annulaire est dégagée entre la base du primordium racinaire et les tissus corticaux de la tige.

Le groupe de plantes représenté par *A. indica* (groupe III) possède une structure du site de nodulation moins évoluée; le primordium racinaire affleure sous une couche de cellules épidermiques intactes.

Le troisième groupe de plantes représenté par *A. elaphroxylon* (groupe d'inoculation croisée I) qui comprend les plantes dont les nodules caulinaires sont seulement localisés sur la partie basse et immergée des tiges, présente la structure la moins évoluée. Le primordium racinaire est inclus dans les tissus corticaux de la tige et l'immersion de la tige est nécessaire à la levée de la dormance du primordium racinaire.

Parmi les différentes espèces d'*Aeschynomene*, *A. afraspera* et *A. nilotica* se caractérisent par une nodulation caulinare abondante, une croissance rapide et une production de biomasse végétale importante. Leur potentiel fixateur d'azote, dont la majeure partie provient de la fixation d'azote par les nodules caulinaires est très élevé. Nous avons estimé les quantités d'azote fixées en 60 jours à 50 g N par m<sup>2</sup>. Par comparaison, les légumineuses utilisées traditionnellement comme engrais vert accumulent en moyenne 100 kg N par ha (Roger et Watanabe, 1986). Les légumineuses à nodules caulinaires, en raison de leur double nodulation, apparaissent nettement plus efficaces que les autres légumineuses. Un avantage supplémentaire non négligeable qui semble caractéristique des légumineuses à nodules caulinaires sur les autres légumineuses est la faible inhibition de la nodulation et de la fixation d'azote par l'azote combiné du sol.

L'utilisation d'*A. afraspera* ou d'*A. nilotica* comme engrais vert en riziculture, dans des expérimentations conduites en microparcelles, a montré qu'il était possible de doubler les rendements en grains du riz.

Des essais comparatifs entre *S. rostrata* et *A. afraspera* utilisés en tant qu'engrais vert ont été réalisés à l'IRRI aux Philippines. Ces essais en vraie grandeur ont confirmé l'excellente qualité de l'engrais vert *A. afraspera* et montré qu'il pouvait même être supérieur à l'engrais vert *S. rostrata*. En cycle de jours longs durant la saison la plus chaude, la même augmentation en rendement en grains de riz est atteinte avec une quantité de matière verte enfouie moins importante pour *A. afraspera* que pour *S. rostrata*, et de surcroît, avec un travail moins intense. De plus, dans tous les cas d'une utilisation en saison à jours courts, la productivité d'*A. afraspera* s'est révélée supérieure à celle de *S. rostrata* (Becker *et al.*, 1991).

Dans les sols déficients en potassium et surtout en phosphore, l'apport de ces éléments peut considérablement augmenter la productivité des *Aeschynomènes* et par conséquent, avoir un effet positif sur la culture de riz suivante. Dans ce cas, l'agriculteur aura tout intérêt à appliquer le fertilisant PK avant la culture de l'*Aeschynomène*.

La diversité des espèces d'*Aeschynomene* à nodulation caulinare laisse à l'utilisateur le choix de l'espèce la mieux adaptée à des conditions pédo-climatiques particulières. Ainsi, sur les Hauts-Plateaux de Madagascar, *S. rostrata* et *A. afraspera* présentent un développement modeste et une productivité végétale très inférieure à celle d'*A. schimperii*, d'*A. sensitiva*, ou d'*A. uniflora*.

L'utilisation des *Aeschynomènes* dans une zone géographique donnée doit cependant être précédée par des études préalables destinées à préciser les potentialités mais aussi les facteurs limitants de la culture de ces plantes. En particulier, il convient de définir un calendrier cultural en tenant compte des disponibilités en eau (pluviométrie, irrigation) ainsi que du comportement des espèces vis-à-vis des paramètres climatiques comme la photopériode ou la température.

La seconde partie de notre travail a porté sur des aspects plus fondamentaux de la symbiose.

Nous avons, en premier lieu, abordé l'étude de l'infection et du développement des nodules sur les tiges d'*A. afraspera*. Nous avons montré que l'infection avait lieu directement dans les cellules corticales situées au fond de la cavité annulaire dégagée autour du primordium racinaire selon un processus ne faisant intervenir ni poils absorbants, ni cordons d'infection. Les cellules infectées initiales apparaissent très volumineuses, leur contour est irrégulier, et elles dégénèrent très rapidement. A ce stade, une zone méristématique est induite à distance dans les tissus corticaux profonds de la tige. L'infection progresse ensuite par la dégénérescence successive de cellules infectées, formant une trace infectieuse depuis le fond de la cavité annulaire jusqu'à la zone méristématique. Après l'infection de la zone méristématique, le développement du nodule est assuré par la division successive des cellules infectées. Ce mode d'infection est, pour l'essentiel, analogue à celui décrit chez l'Arachide et chez *Stylosanthes* (Chandler, 1978; Chandler *et al.*, 1982). Cependant, notre étude est, à notre connaissance, la première à préciser le mode d'entrée des rhizobia dans les cellules corticales, lesquelles en dégénérant, constitueront la trace infectieuse. Nous avons, en outre, observé la présence de zones d'infection particulières dans les jeunes nodules. Ces zones d'infection ont été désignées comme secondaires et interprétées comme le résultat d'une surinfection des sites de nodulation. Le développement des infections secondaires semble bloqué au stade "grandes cellules infectées" décrites lors du déroulement normal du processus d'infection.

Il est généralement admis que l'infection par l'intermédiaire des poils absorbants correspond à un caractère plus évolué des espèces de légumineuses chez lesquelles ce processus intervient (Sprent *et al.*, 1987). Ainsi, la voie empruntée par les rhizobia pour infecter les tiges d'*A. afraspera* serait un mode d'infection primitif rappelant une interaction entre une plante hôte et un parasite.

Le processus d'infection initiale qui s'effectue par la voie des tissus lésés au point d'émergence d'une racine adventive et l'originalité du mode de développement du nodule où seule intervient la division des cellules infectées, font d'*A. afraspera* un modèle expérimental de tout premier plan pour l'étude des interactions hôte-micro-organisme au niveau cellulaire. Jusqu'à ce jour en effet, les différentes tentatives de reconstitution de la symbiose *in vitro*, effectuées avec un matériel végétal -soja ou *S. rostrata*- chez lequel les cordons d'infection interviennent dans le processus naturel d'infection, n'ont pas donné de résultats convaincants (Holsten *et al.*, 1971; Duhoux et Alazard, 1983).

L'étude des propriétés physiologiques des rhizobia d'*Aeschynomene* a montré que la plupart des souches isolées des nodules caulinaires ont un temps de génération qui permet de les ranger dans le groupe des rhizobia à croissance rapide. Outre l'expression d'une activité nitrogénase élevée en culture pure, que ce soit en milieu gélosé semi-solide ou en milieu liquide sous de faibles tensions d'oxygène, ils sont capables de croître aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote. Ces propriétés, exceptionnelles pour la plupart des rhizobia, sont la caractéristique principale du genre *Azorhizobium* et des fixateurs libres. Or, l'étude systématique de ces souches, basée sur l'analyse numérique de leurs caractères phénotypiques et sur leurs caractéristiques génotypiques, les classe sans équivoque dans le genre *Bradyrhizobium*. Des études complémentaires (hybridations ADN:ADN et stabilité thermique des hybrides  $-\Delta T_m(e)-$ ) devront être menées afin de déterminer si ces souches constituent ou non une espèce nouvelle dans le genre *Bradyrhizobium*.

D'autre part, en rendant possible la sélection de mutants directement sur milieu de culture, ces rhizobia constituent un matériel de choix pour l'analyse biochimique et génétique de la fixation d'azote qui, en général chez les *Bradyrhizobia*, ne s'exprime qu'en association avec la plante. L'étude de la fixation d'azote *in vitro* devrait être un thème de recherche à privilégier dans les études futures.

Une autre voie d'étude à développer est celle des relations entre les rhizobia isolés des nodules caulinaires de certaines espèces d'*Aeschynomene* et la photosynthèse. Il serait intéressant de connaître dans quelle mesure, d'une part la fixation d'azote par les très nombreux nodules caulinaires d'*A. afraspera* est limitée par la quantité d'énergie qui peut leur être fournie par la photosynthèse foliaire, et d'autre part de déterminer si les nodules caulinaires, dont le cortex est chlorophyllien, peuvent être considérés comme des unités autonomes du point de vue énergétique. Enfin, les récents travaux menés au Boyce Thompson Institute (Cornell University, Ithaca, USA), laissent penser que les rhizobia d'*Aeschynomene*, micro-organismes fixant ou ayant fixé à la fois l'azote et le carbone, pourraient constituer un chaînon manquant important dans l'évolution des micro-organismes. Ces bactéries dont l'ancêtre aurait été à la fois fixateur d'azote libre et capable de photosynthèse - les Bradyrhizobia sont phylogénétiquement apparentés aux *Rhodopseudomonas* -, pourraient être celles qui ont réalisé, les premières, la symbiose avec les légumineuses. La symbiose à nodulation caulinaire des Aeschynomènes constituerait ainsi l'une des symbioses les plus primitives parmi les légumineuses. Il est en effet difficilement imaginable que les rhizobia aient pu acquérir la capacité de fixer l'azote après avoir été capable d'infecter les légumineuses alors que la fixation biologique de l'azote est un processus extrêmement complexe et, qui plus est, totalement inconnu chez les organismes eucaryotes. L'observation d'une relation du type hôte-parasite mise en évidence lors des étapes initiales de l'infection des tiges chez *A. afraspera* et la parenté phylogénétique des *Bradyrhizobium* avec les *Rhodopseudomonas*, renforcent cette hypothèse.

Ainsi, la symbiose caulinaire chez *Aeschynomene* constitue un système fixateur d'azote original et extrêmement prometteur par les perspectives de recherche qu'il présente, tant sur le plan des applications agronomiques que sur celui des recherches fondamentales. Le développement des recherches sur le système fixateur d'azote décrit dans ce mémoire contribuera sans doute, grâce aux propriétés originales de chacun des partenaires de la symbiose, à une meilleure connaissance de la fixation de l'azote par les rhizobia *in vivo* et *ex planta* et, plus généralement, de la symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADANSON, M., 1763. Famille des plantes, Vol. 1, Vincent, Paris.
- AGARWAL, A. K., KEISTER, D. L., 1983. Physiology of *ex planta* nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1592-1601.
- AISTE, J. M., 1977. Mechanically induced wall appositions of plant cells can prevent penetration by a parasitic fungus. Science, 197: 568-571.
- ALAZARD, D., 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Environ. Microbiol., 50: 732-734.
- ALAZARD, D., BECKER, M., 1987. *Aeschynomene* as green manure for rice. Plant and Soil, 101: 141-143.
- ALAZARD, D., DUHOUX, E., 1987. Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*. Biol. Fert. Soils, 4: 61-66.
- ALAZARD, D., DUHOUX, E., 1988. Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. J. Plant Physiol., 132: 123-125.
- ALAZARD, D., DUHOUX, E., 1990. Development of stem nodules in a tropical legume forage *Aeschynomene afraspera*. J. Exp. Bot, 41: 1199-1206.
- ALAZARD, D., 1990. Nitrogen fixation in pure cultures by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. FEMS Microbiol. Lett., 68: 177-182.
- ALLEN, O. N., ALLEN, E. K., 1981. The *Leguminosae*: a source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison; pp. 21-25.
- ALLEN, O. N., ALLEN, E. K., 1940. Response of the peanut plant to inoculation with rhizobia with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz., 102: 121-142.
- ARORA, N., 1954. Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. Phytomorphology, 4: 211-216.
- BAUER, W. D., 1981. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol., 32: 407-409.
- BECKER, M., ALAZARD, D., OTTOW, J. C. G., 1986. Mineral effect on nodulation and nitrogen fixation on the stem-nodulating legume *Aeschynomene afraspera*. Z. Pflanzeneraehr. Bodenk., 149: 485-491.

- BECKER, M., LADHA, J. K., OTTOW, J. C. G., 1990. Growth and N<sub>2</sub>-fixation of two stem-nodulating legumes and their effect as green manure on lowland rice. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 1109-1119.
- BEDMAR, E. J., OLIVARES, J., 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living *Rhizobium meliloti*. *Curr. Microbiol.*, 2: 11-13.
- BENDER, G., PLAZINSKI, J., ROLFE, B. G., 1986. Asymbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea *Rhizobium* strain with nitrogenase structural genes located on a symbiotic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 868-871.
- BENHARD, W., 1969. A new staining procedure for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 27: 250-265.
- BERGERSEN, F. G., TURNER, G. L., 1967. Nitrogen fixation in the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta*, 141: 507- 515.
- BERHAUT, J., 1976. Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédons. Tome IV, Légumineuses papillonacées. *Edité par* Gouvern. du Sénégal; p. 27.
- BREMNER, J., 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J. Agric. Sci.*, 55: 11-33.
- CALLAHAM, D. A., TORREY, J. G., 1981. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.*, 59: 1647-1664.
- CALVERT, H. E., PENCE, M. K., PIERCE, M., MALIK, N. S. A., BAUER, W. D., 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.*, 30: 2373-2384.
- CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J. S., MICHEL, M., DENARIE, J., 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229-242.
- CHAKRABARTI, S. K., MISHRA, A. K., CHAKRABARTTY, P. K., 1986. A note on physiological characteristics and genetic relatedness of a fast-growing *Rhizobium* from stem nodules of *Aeschynomene aspera* L. *J. Appl. Bacteriol.*, 60: 463-468.
- CHANDLER, M. R., 1978. Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.*, 29: 749-755.
- CHANDLER, M. R., DATE, R. A., ROUGHLEY, R.J., 1982. Infection and root nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.*, 33: 47-57.
- CHEN, W.X., YAN, G. H., LI, J. L., 1988. Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bact.*, 38: 392-397.



- CORNELL UNIVERSITY PRESS, 1988. Bacterial "missing link" may help more plant fix nitrogen. 2 p.
- CORBY, H.D.L., 1981. The systematic value of leguminous root nodules. *Dans: Advances in legume systematics*, vol. 2. *Edité par* R.M. Polhill et P.H. Raven; Royal Botanic Gardens, Kew; pp. 657-669.
- CROW, V. L., JARVIS, B. D. W., GREENWOOD, R. M., 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing-strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31: 152-172.
- DART, P. J., 1977. Infection and development of leguminous nodules. *Dans: A treatise of dinitrogen fixation*, section III, Biology. *Edité par* R. W. F. Hardy et W.S. Silver; John Wiley and sons, New-York; pp. 367-472.
- DATE, R. A., HALLIDAY, J., 1980. Relationships between *Rhizobium* and tropical forage legumes. *Dans: Advances in legume sciences*. *Edité par* R. J. S. Summerfield et A. H. Bunting; Royal Botanic Gardens, Kew; pp. 57-601.
- DAZZO, F. B., HUBBELL, D. H., 1975. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Appl. Microbiol.*, 30: 1017-1033.
- DE LEENHEER, I., 1989. Genotypie en fenotypie van rhizobia uit *Acacia* en *Aeschynomene*. Licentiaat in de Wetenschappen groep, plantkunde, richting Biotechnologie, Rijksuniversiteit Gent, 123 p.
- DE LEY, J., 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 101: 738-754.
- DE LEY, J. 1981. Evolution des cistrons codant pour l'ARN-r bactérien. *Symbioses*, 13: 109-121.
- DE LEY, J., VAN MUYLEM, J., 1963. Some applications of deoxyribonucleic acid base composition in bacterial taxonomy. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 29: 344-358.
- DE LEY, J., RASSEL, A., 1965. DNA base composition, flagellation, and taxonomy. *J. Gen. Microbiol.*, 41: 85-91.
- DE SMEDT, J., DE LEY, J., 1977. Intra- and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27: 222-240.
- DE VOS, P., GOOR, M., GILLIS, M., DE LEY, J., 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of the phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 169-184.

- DOBEREINER, J., DAY, J.M., 1976. Associative symbiosis and free-living systems. *Dans*: Proc. 1st Int. Symposium on nitrogen fixation. *Édité par* W. E. Newton et C. J. Nymans; Washington State University Press, Pullman; pp. 518- 538.
- DOMMERGUES, Y. R., 1982. Whither soil research? 12th Int. Cong. Soil Sci., Ind Sci., IARI, New-Delhi, pp. 138-149.
- DREYFUS, B., 1982. La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*, légumineuse à nodules caulinaires. Thèse de doctorat d'état, Université de Paris 7; 120p.
- DREYFUS, B., DOMMERGUES, Y., 1980. Non-inhibition de la fixation d'azote atmosphérique par l'azote combiné chez une légumineuse à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata*. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 291: 767-770.
- DREYFUS, B.L., DOMMERGUES, Y. R., 1981. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett., 10: 313-317.
- DREYFUS, B. L., ALAZARD, D., DOMMERGUES, Y. R., 1984. Stem-nodulating rhizobia. *Dans*: Current Perspectives in Microbial Ecology. New and unusual microorganisms and niches. *Édité par* M. J. Klug et C. A. Reddy; American Society for Microbiology, Washington D. C.; pp. 161-169.
- DREYFUS, B.L., ELMERICH, C., DOMMERGUES, Y. R., 1983. Free-living *Rhizobium* strains able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. Appl. Environ. Microbiol., 45: 711-713.
- DREYFUS, B. L., GARCIA, J. L., GILLIS, M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen- fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol., 38: 89-98.
- DUHOUX, E., 1984. Ontogénèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (légumineuse). Can. J. Bot., 62: 982-994.
- DUHOUX, E., ALAZARD, D., 1983. Culture *in vitro* de nodules de *Sesbania rostrata*: mode d'infection des tissus néoformés et comparaison avec l'infection chez la plante. C. R. Acad. Sc. Paris, Série III, 296: 93-100.
- DUHOUX, E., DREYFUS, B. L., 1982. Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse *Sesbania rostrata* Brem. C. R. Acad. Sc. Paris, Série III, 294: 407-411.
- EADY, R.R., SMITH, B.E., 1979. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. *Dans* : A treatise on dinitrogen fixation, sections I et II. *Édité par* R. W. F. Hardy, F. Bottomley et R. C. Burns ; John Wiley and sons, New-York; pp. 399-490.
- EAGLESHAM, A. R. J., ELLIS, J. M., EVANS, W. R., FLEISCHMAN, D. E., HUNGRIA, M., HARDY, R. W. F., 1990. The first photosynthetic N<sub>2</sub>-fixing

- Rhizobium*: Characteristics. Abstracts of the 8th Int. Cong. on Nitrogen Fixation (L-56); May 20-26; Knoxville, Tennessee, USA.
- EAGLESHAM, A. R. J., HASSOUNA, S., SEEGER, R., 1983. Fertilizer N effect on N<sub>2</sub>-fixation by cowpea and soybean. *Agron. J.*, 75: 61-62.
- EAGLESHAM, A. R. J., SZALAY, A. A., 1983. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. *Plant Sci. Lett.*, 29: 265-272.
- ELMERICH, C., DREYFUS, B. L., REYSSET, G., AUBERT, J. P., 1982. Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing *Rhizobium*. *EMBO J.*, 1: 499-503.
- EMERICH, D. W., BURRIS, R. H., 1978. Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *J. Bacteriol.*, 134: 936-943.
- EVANS, W. R., FLEISCHMAN, D. E., CALVERT, H. H., PYATI, P. V., ALTER, G. M., SUBBA RAO, N. S., 1990. Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3445-3449.
- FARIA, S.M. De, FRANCO, A.A., JESUS, R. M. De, MENANDRO, M. De S., BAITELLO, J. B., MUCCI, E. S. F., DOBEREINER, J., 1984. New nodulating legume trees from south-east Brazil. *New Phytol.*, 98: 317-327.
- FARIA, S.M. De, HAY, G. T., SPRENT, J. I., 1988. Entry of rhizobium into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 2291-2296.
- FYSON, A., SPRENT, J. I., 1980. A light and scanning electron microscope study of stem nodules in *Vicia faba* L. *J. Exp. Bot.*, 31: 1101-1106.
- FLEISCHMAN, D., EVANS, W. R., EAGLESHAM, A. R. J., CALVERT, A. H., DOLAN, E. Jr., SUBBA RAO, N. S., SHANMUGASUNDARAM, S., 1989. Photosynthetic properties of stem nodule rhizobia. *Int. Symp. and Workshop on Biological Nitrogen Fixation associated with rice production and rice culture*, Cuttack, Inde. Oxford and IBH Publ. Co. Pvt Ltd, New-Delhi, p.11 (sous presse).
- FRED, E. B., BALDWIN, I. L., MC COY, E., 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *Wisconsin University Studies in Science*, n°5; University Wisconsin Press, Madison; p. 343.
- GEBHARDT, C., TURNER, G.L., GIBSON, A.H., DREYFUS, B.L., BERGERSEN, F.J., 1984. Nitrogen-fixing growth in continuous culture of a strain of *Rhizobium* sp. isolated from stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 843-848.
- GIBBONS, A. M., GREGORY, K. F., 1972. Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.*, 111: 129-141.

- GIBSON, A. H., 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Austr. J. Biol. Sci.*, 16: 28-42.
- GIBSON, A.H., PAGAN, J.D., 1977. Nitrate effect on the nodulation of legumes inoculated with nitrate reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta*, 134: 17-22.
- GIBSON, A. H., SCOWCROFT, W. R., CHILD, J. J., PAGAN, J. D., 1976. Nitrogenase activity in cultured *Rhizobium* sp. strain 32H1. *Arch. Microbiol.*, 108: 45-54.
- GILLIS, M., DE LEY, J., 1980. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 7-27.
- GOODCHILD, D.J., 1977. The ultrastructure of root nodules in relation to nitrogen fixation. *Int. Rev. Cytol.*, 6: 125-139.
- GOURRET, J.P., 1974. Classification des *Rhizobium* d'après les données ultrastructurales et cytochimiques de leur différenciation dans les nodules de légumineuses. *J. Microscopie*, 20: 54-55.
- GOURRET, J.P., 1978. Description et interprétation des nucléoïdes structurés observés dans des bactéroïdes de *Rhizobium*. *Biol. Cell.*, 32: 299-306.
- GRAHAM, P. H., 1964a. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.*, 35: 511-517.
- GRAHAM, P. H., 1964b. Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 30: 68-72.
- GRAHAM, P. H., 1969. Analytical serology of the *Rhizobiaceae*. *Dans: Analytical serology of microorganisms*, vol. 2. *Edité par J. B. Kwapinski*; John Wiley and Sons, New-york; pp. 357-378.
- GRAHAM, P.H., CHATEL, D.L., 1983. Agronomy. *Dans: Nitrogen fixation*, vol.3. *Edité par W. J. Broughton*. Oxford University Press, Oxford; pp. 56-98.
- GREEN, P. N., GILLIS, M., 1989. Classification of *Pseudomonas aminovorans* and some related methylated amine utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2071-2076.
- HAGERUP, O., 1928. En hygrefil baelgplante (*Aeschynomene aspera* L.) med bakterieknolde paa staenglen. *Dansk. Bot. Arkiv.*, 14: 1-9.
- HARDY, R. W. F., HAVELKA, U.D., 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food? *Science*, 188: 633-643.

- HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K., BURNS, R.C., 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207.
- HEBERLEIN, G. T., DE LEY, J., TYTGAT, R., 1967. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Chromobacterium*. *J. Bacteriol.*, 94-124.
- HEWITT, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Techn. Comm. N° 22; 2<sup>nd</sup> Edn Commonw. Bur. Hort. Plntn Crops*; Farnham Royal, England; 547 p.
- HOLLIS, A. B., KLOOS, W. E., ELKAN, G. H., 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.*, 123: 215-222.
- HOLSTEN, R. D., BURNS, R. C., HARDY, R. W. F., HEBERT, R.R., 1971. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. *Nature*, 232, 173-176.
- JAKOBSEN, I., 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants. *Physiol. Plant.*, 64: 190-196.
- JARVIS, B. D. W., DICK, A. G., GREENWOOD, R.M., 1980. Deoxyribonucleic acid homology among strains of *Rhizobium trifolii* and related species. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 30: 42-52.
- JARVIS, B. D. W., GILLIS, M., DE LEY, J., 1986. Intra- and intergeneric similarities between ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 129-138, 1986.
- JORDAN, D. C., 1982. Transfert of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 136-139.
- JORDAN, D. C., 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. *Dans: Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. *Edité par* N. R. Krieg et J. G. Holt; The Williams and Wilkins Co., Baltimore; pp. 234-244.
- KAMINSKI, P. A., NOREL, F., DESNOUES, N., KUSH, A., SALSANO, G., ELMERICH, C., 1988. Characterization of the *fix* ABC region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. *Mol. Gen. Genet.*, 214: 496-502.
- KANESHIRO, T., CROWELL, C. D., HANRAHAN, R. F., Jr, 1978. Acetylene reduction activity in free-living culture of rhizobia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28: 27-31.
- KEISTER, D. L., 1975. Acetylene reduction in pure culture of rhizobia. *J. Bacteriol.*, 123: 1265-1278.

- KEYSER, H. H., BEN BOHLOOL, B., HU, T. S., WEBER, D. F., 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of nodules of soybean. *Science*, 215: 1631-1632.
- KRETSCHMER, A. E. Jr., BULLOCK, R. C., 1979. *Aeschynomene* spp.: distribution and potential use. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.*, 39: 145-152.
- KURZ, W. G. M., La RUE, T. A., 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature*, 256: 407-408.
- LANCELLE, S. A., TORREY, J. G., 1985. Early development of *Rhizobium*-induced root nodules of *Parasponia rigida*. II. Nodule morphogenesis and symbiotic development. *Can. J. Bot.*, 63: 25-35.
- LATIMORE, M., GIDDENS, J.J., ASHLEY, D.A., 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthetate supply and nitrogen fixation by soybeans. *Acta Phytochem.*, 11: 195-200.
- LEROUGE, P., ROCHE, P., FAUCHER, MAILLET, F., TRUCHET, G., PROMÉ, J. C., DENARIE, J., 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344: 781-784.
- LIBBENGA, K. R., HARKES, P. A. A., 1973. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum*. *Planta*, 114: 17-28.
- LINDSTRÖM, K., 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 365-367.
- LISON, L., 1960. *Histochimie et cytologie animale. Principes et méthodes*. Gauthier-Villars, Paris.
- LONG, S. R., 1989. *Rhizobium*-Legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*, 56: 203-214.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MAC COMB, J. A., ELLIOT, J., DILWORTH, M. J., 1975. Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. *Nature*, 256: 409-410.
- MARMUR, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-218.
- MARMUR, J., DOTY, P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, 5: 109-118.
- MARTINEZ-DE DRETS, G., ARIAS, A., 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. *J. Bacteriol.*, 109, 467- 470.

- MOFFETT, M.L., COLWELL, R., 1968. Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. J. Gen. Microbiol., 51: 245-266.
- MOHAPATRA, S. S., BENDER, G. L., SHINE, J., ROLFE, B. G., 1983. In vitro expression of nitrogenase activity in *Parasponia-Rhizobium* strain ANU289. Arch. Microbiol., 134: 12-16.
- MOUDIONGUI, A., RINAUDO, G., 1987. Effect of ammonium nitrate on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of the tropical legume *Sesbania rostrata*. MIRCEN J., 3: 235-241.
- MUNNS, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effect of nitrate on root hairs and infection. Plant and Soil, 29: 33-47.
- MUNNS, D.N., 1977. Mineral nutrition and the legume symbiosis. *Dans*: A treatise on dinitrogen fixation, section IV. *Edit  par* R. W. F. Hardy and A.H. Gibson; John Wiley and sons, New-York; pp. 353-391.
- NAMBIAR, P. T. C., DART, P. J., SRINIVASA RAO, B., RAMANATHA RAO, V., 1982. Nodulation in the hypocotyl region of groundnut (*Arachis hypogaea*). Expl. Agric., 18: 203-207.
- NEWCOMB, W., 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *Dans*: Int. Rev. Cytol., suppl. N  13; *Edit  par* K. L. Giles et A. G. Atherly; Academic Press, London; pp. 247-298.
- NEWCOMB, W., PETERSON, R. L., CALLAHAM, D. A., TORREY, J.G., 1978. Structure and host-actinomycete interactions in developing root nodules of *Comptonia peregrina*. Can. J. Bot., 56: 502-531.
- NORRIS, N. O., 1965. Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. Plant and Soil, 22: 143-166.
- NUTMAN, P. S., 1956. The influence of the legume in root-nodule symbiosis. Biol. Rev., 31: 109-151.
- NUTMAN, P. S., 1965. Origin and developmental physiology of root nodules. *Dans*: Encyclopedia of plant physiology, 15. Part 1; *Edit  par* W. Ruhland; Springer, Berlin; pp. 1355-1379.
- NUTI, M. P., LEDEBOER, A. M., LEPIDI, A. A., SCHILPEROOT, R. A., 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. J. Gen. Microbiol., 100: 241-248.
- O'GARA, F., SHANMUGAN, K. T., 1976. Regulation of nitrogen fixation by rhizobia. Biochim. Biophys. Acta, 437: 313-321.
- PAGAN, J. D., CHILD, J. J., SCOWCROFT, W. R., GIBSON, A. H., 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on defined medium. Nature, 256: 406-407.

- PANKHURST, C. E., SCOTT, D. B., RONSON, C. W., 1982. Correlation between rifampycin-resistance of slow-growing *Rhizobium* and their ability to express nitrogenase in culture. FEMS Microbiol. Lett., 15: 137-139.
- PATNAIK, S., RAO, M. V., 1979. Sources of nitrogen for rice production. *Dans: Nitrogen and rice*. IRRI Publ., Manille, Philippines; pp. 25-43.
- PETERS, N. K., FROST, J. W., LONG, S. R., 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science, 233: 977-980.
- PFENNIG, N., TRÜPER, H. G., 1974. Famille 1. *Rhodospirillaceae* Pfennig and Trüper 1971. The phototrophic bacteria, Part1. *Dans: Bergey 's manual of determinative bacteriology*, 8<sup>th</sup> edition. *Edité par* R. E. Buchanan et N. G. Gibbons; The Williams and Wilkins Co., Baltimore; pp. 26-34.
- POLHILL, R. M., RAVEN, P. H., STIRTON, C. H., 1981. Evolution systematics of the leguminosae. *Dans: Advances in Legume Systematics. Edité par* R. M. Polhill et P. H. Raven; Royal Botanic Gardens, Kew; pp. 1-26.
- POSTGATE, J., 1981. Microbiology of the free-living nitrogen-fixing bacteria, excluding cyanobacteria. *Dans: Current perspectives in nitrogen fixation. Edité par* A.H. Gibson et W.E. Newton; Australian Academy of Science; pp. 217-228.
- PRIN, Y., DUHOUX, E., DIEM, H. G., ROEDERER, Y., DOMMERGUES, Y. R., 1991. Aerial nodules in *Casuarina cunninghamiana*. Appl. Environ. Microbiol., 57:871-874.
- RANGA RAO, V., 1977. Effect of root temperature on the infection process of *Lotus* and *Stylosanthes*. J. Exp. Bot., 28: 241-259.
- RANGA RAO, V., KEISTER, D. L., AGARWAL, A. K., 1982. Non-symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. J. Sci. Ind. Res., 41: 507-513.
- REYNOLDS, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-212.
- RHODES, M. E., 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by silver- plating staining method. J. Gen. Microbiol., 18: 639-648.
- RICHARDS, G. M., 1974. Modification of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. Anal. Biochem., 57: 369-376.
- RIGAUD, J., 1976. Effet des nitrates sur la fixation d'azote par les nodules de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Physiol. Veg., 14: 297-308.
- RIGAUD, J., 1981. Comparison of the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop field. *Dans: Nitrogen and carbon metabolism. Edité par* J. D. Bewley; Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 17-48.



- RINAUDO, G., DREYFUS, B. L., DOMMERGUES, Y. R., 1983. Influence of *Sesbania rostrata* green manure on the nitrogen content of rice crop and soil. *Soil Biol. Biochem.*, 15: 111-113.
- RINAUDO, G., MOUDIONGUI, A., 1985. Fixation d'azote par *Sesbania rostrata*:: son utilisation comme engrais vert. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 20: 833-849.
- ROBERTS, G. P., LEPS, W. T., SILVER, L. E., BRILL, W. J., 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 414-422.
- ROGER, P. A., WATANABE, I., 1986. Technologies for utilizing nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limitation factors. *Fert. Res.*, 9: 39-77.
- RYTER, A., KELLENBERGER, E., 1958. Etude au microscope électronique des plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. *Z. Naturforsch.*, 13: 597- 605.
- SCHAEDE, R., 1940. Die knöllchen der adventiven wasserwurzeln von *Neptunia oleracea* und ihre bakteriensymbiose (The nodules of the adventitious water roots of *Neptunia oleracea* and their bacterial symbiosis). *Planta*, 31: 1-21.
- SCHOLLA, M. H., ELKAN, G. H., 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast- growing species that effectively nodulate soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 484-486.
- SEN, D., WEAVER, R. W., BAL, A. K., 1986. Structure and organization of effective peanut and cowpea root nodules induced by rhizobial strain 32H1. *J. Exp. Bot.*, 37: 356-363.
- SHANMUGAN, K. T., O'GARA, F., ANDERSEN, K., VALENTINE, R. C., 1978. Biologocal nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29:263-276.
- SHINDU, S. S., DADARWAL, K. R., 1986. *Ex planta* nitrogenase induction and uptake hydrogenase in *Rhizobium* sp. (cowpea miscellany). *Soil Biol. Biochem.*, 18: 291-295.
- SMIBERT, R. M., KRIEG, N. R., 1981. General characterization. *Dans: Manual of methods for general bacteriology. Edité par P. Gehrhardt, R. G. E. Murray, R.N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg et G. B. Phillips; American Society for Microbiology, Washington D. C.; pp. 409-443.*
- SOKAL, R.R., MICHENER, C. D., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 38: 1409-1438.
- SPRENT, J. I., 1989. Which are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.*, 111: 129-153.
- SPRENT, J.I., SUTHERLAND, J. M., FARIA, S. M. De, 1987. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 317: 111-129.

- SPRENT, J. I., FARIA, S. M. De, 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. *Plant and Soil*, 110: 157-165.
- STAM, H., VERSEVELD, van H. W., STOUTHAMER, A. H., 1983. Derepression of nitrogenase in chemostat cultures of the fast-growing *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.*, 135: 199-204.
- STEWART, W. D. P., 1980. Systems involving blue-green algae (cyanobacteria). *Dans: Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Édité par F. J. Bergersen; John Wiley and sons, New-York; pp. 583-636.*
- STEWART, W. D. P., HAYSTEAD, A., PEARSON, H. W., 1969. Nitrogenase activity of blue green algae. *Nature*, 224: 226-228.
- STOWERS, M. D., 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 89-108.
- STOWERS, M. D., EAGLESHAM, A. R. J., 1983. A stem-nodulating *Rhizobium* with physiological characteristics of both fast and slow growers. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3651-3655.
- STREETER, J.G., 1981. Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. *Plant Physiol.*, 68: 840-844.
- SUBBA RAO, N. S., YATAZAWA, M., 1984. Stem nodules. Chap. 4. *Dans: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Édité par N. S. Subba Rao; Oxford et IBH Publish. Co., New-Delhi - Bombay - Calcutta; pp. 101-110.*
- SUESSENGUTH, K. Von, BEYERLE, R., 1936. Über bakterien-sknöllchen am spross von *Aeschynomene paniculata* Willd. *Hedwigia*, 75: 234-237.
- TARR, S. A. J., 1972. *Principles of plant physiology*. Macmillan Press, London.
- TJEPKEMA, J. D., EVANS, H. J., 1975. Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 625-628.
- 'T MANNETJE, L., 1967. A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol. Serol.*, 33: 477-491.
- TRUCHET, G., MICHEL, M., DENARIE, J., 1980. Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation*, 16: 163-172.
- TSIEN, H. C., DREYFUS, B. L., SCHMIDT, E. L., 1983. Initial stages in morphogenesis of the nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.*, 156: 888-897.

- TURGEON, B. G., BAUER, W. D., 1982. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium*. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.*, 60: 152-161.
- URBAN, J. E., DAVIS, L. C., BROWN, S. J., 1986. *Rhizobium trifolii* 0403 is capable of growth in the absence of combined nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1060-1067.
- VAN LANDSCHOOT, A., DE LEY, J., 1983. Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other Gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3057-3074.
- VAUGHN, K. C., ELLMORE, C. D., 1985. Ultrastructural characterization of nitrogen-fixing stem nodules of *Aeschynomene indica*. *Cytobios*, 42: 49-62.
- VERMA, D. P. S., FORTIN, M. G., STANLEY, J., MAURO, V. P., PUROHIT, S., MORRISON, N., 1986. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.*, 7: 51-61.
- VINCENT, J. M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook N°15, Blackwell Sci. Publ., Oxford and Edinburgh; 164 p.
- VINCENT, J. M., 1977. *Rhizobium*: general microbiology. Dans: A treatise of dinitrogen fixation, section III, Biology. *Edité par* R. W. F. Hardy et W. S. Silver; John Wiley and sons, New-York; pp. 277-366.
- WALTER, C. A., BIEN, A., 1989. Aerial root nodules in the tropical legume, *Pentacthra macroloba*. *Oecologia*, 80: 27-31.
- WEBER, C. R., 1966. Nodulating and non-nodulating soybean isolines. *Agron. J.*, 58: 43-46.
- WOESE, C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- YATAZAWA, M., YOSHIDA, S., MAEDA, E., 1984. Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30: 405-416.



**ANNEXE :**  
**PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES**

## PLANCHE I

**Figure 1 :** Nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*.

**Figure 2 :** Nodules sur les tiges de *Neptunia oleracea*. Les nodules sont localisés au point d'émergence des racines qui se développent au niveau des noeuds de la tige de la plante lorsque celle-ci est cultivée en conditions inondées.

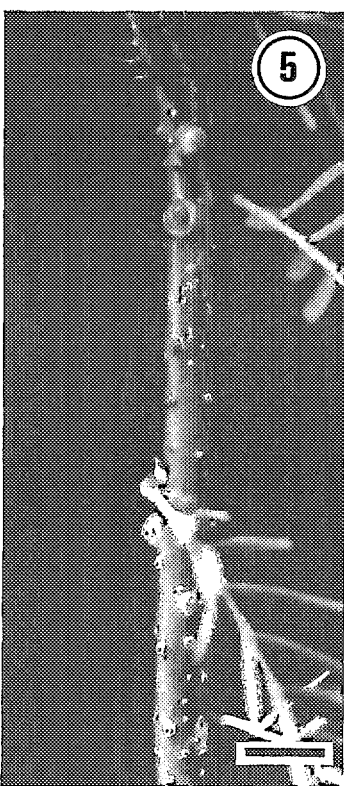
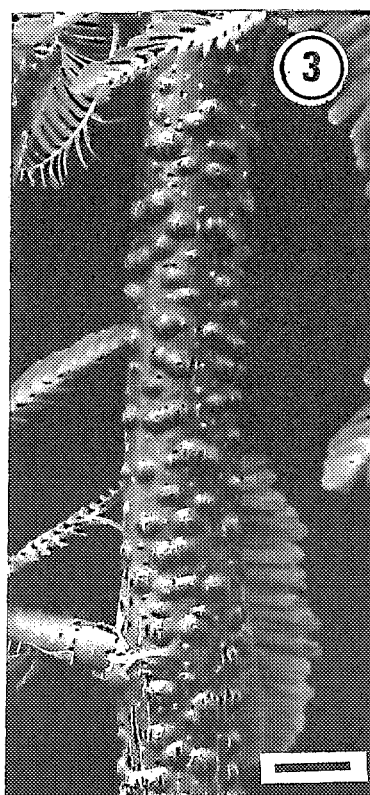
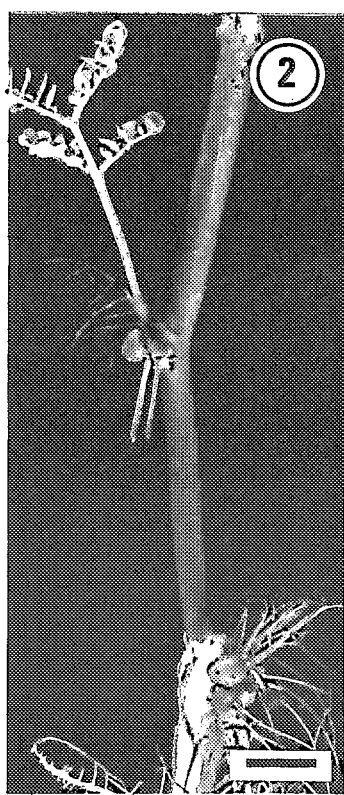
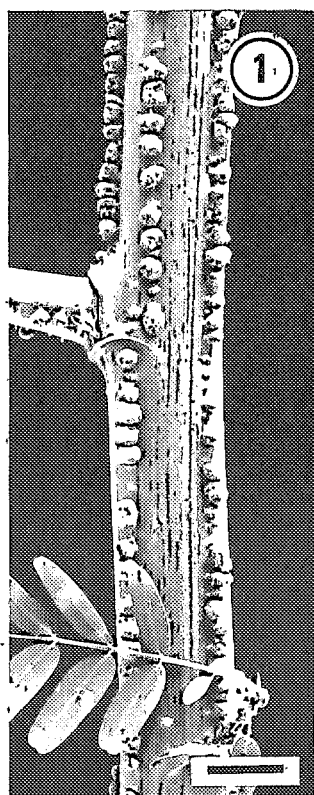
**Figure 3 :** Nodules caulinaires d' *Aeschynomene afraspera*.

**Figure 4 :** Nodules caulinaires d'*Aeschynomene uniflora* cultivée pendant la saison des pluies.

**Figure 5 :** Nodules formés sur les tiges d'*Aeschynomene crassicaulis*.

**Figure 6 :** Tige d' *A. afraspera* après immersion dans l'eau pendant 4 jours. Les sites de nodulation ont donné naissance à des racines adventives.

La barre sur les photographies représente 1 cm.



## PLANCHE II

**Figures 7, 9, et 11:** Nodules caulinaires fixateurs d'azote (N) et sites de nodulation non infectés (S) présents sur les tiges des différents types d'espèces d'*Aeschynomene*. Chaque espèce est représentative d'un groupe d'inoculation croisée de plantes.

**Fig.7 :** Plante d' *A. afraspera* âgée de 6 semaines, 25 jours après l'inoculation avec la souche ORS322.

**Fig.9:** Plante d' *A.indica* âgée de 8 semaines, 25 jours après l'inoculation avec la souche ORS310.

**Fig.11 :** Plante d'*A. elaphroxylon* âgée de 4 mois, 1 mois après l'inoculation avec la souche ORS304.

La barre représente 1 cm.

**Figures 8, 10, et 12:** Morphologie des sites de nodulation. Coupes longitudinales des sites de nodulation non infectés sur les tiges des plantes représentatives de chacun des 3 groupes de plantes montrant des degrés de développement différents.

**Fig. 8:** *A. afraspera*.

**Fig. 10:** *A. indica*.

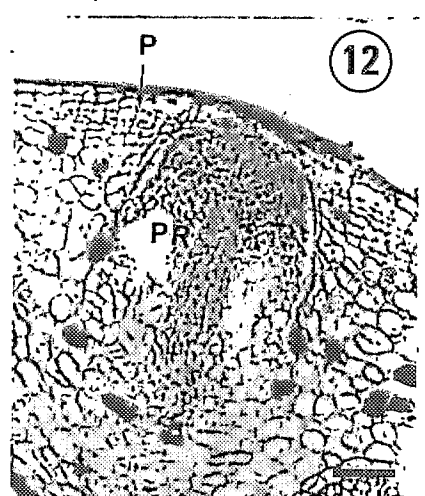
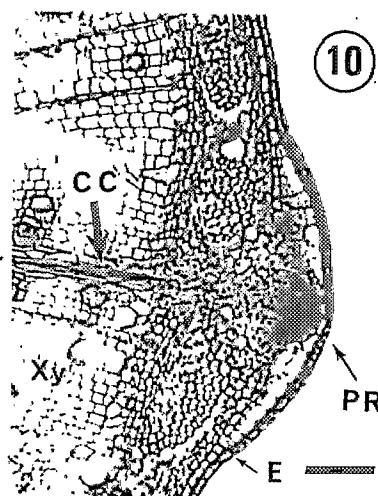
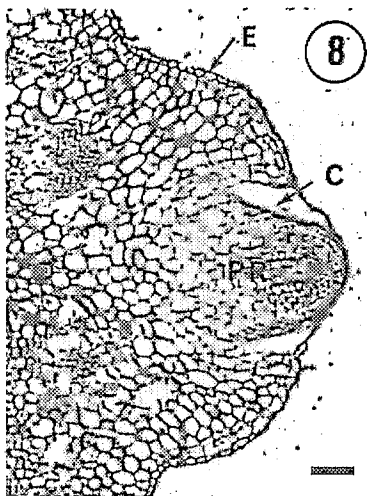
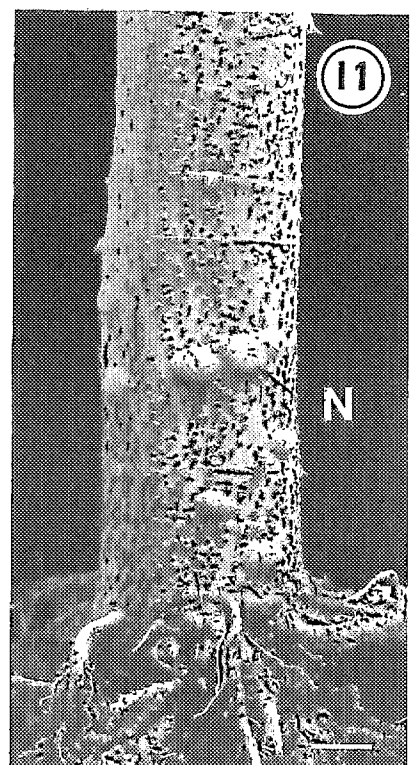
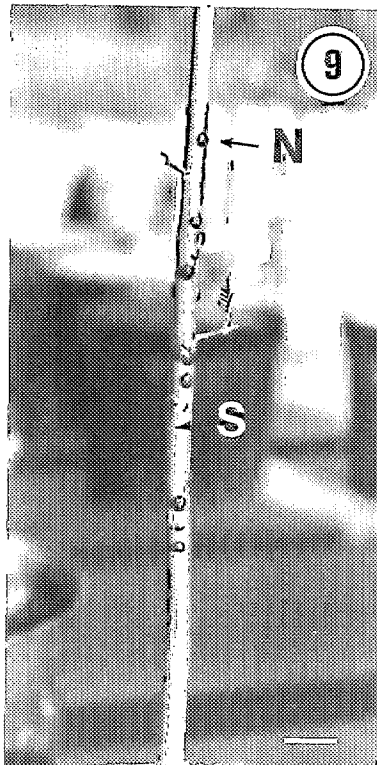
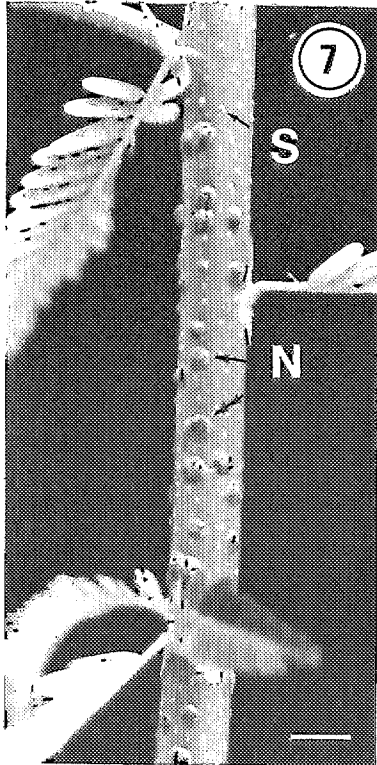
**Fig. 12:** *A. elaphroxylon*.

La barre représente 0,1 mm.

Fixation FAA; inclusion dans le Paraplast (+); coloration par le bleu de toluidine à 0,1%.

Abréviations: C, cavité; CC, cylindre central; E, épiderme; P, périderme; PR, primordium racinaire; Xy, xylème.





## PLANCHE III

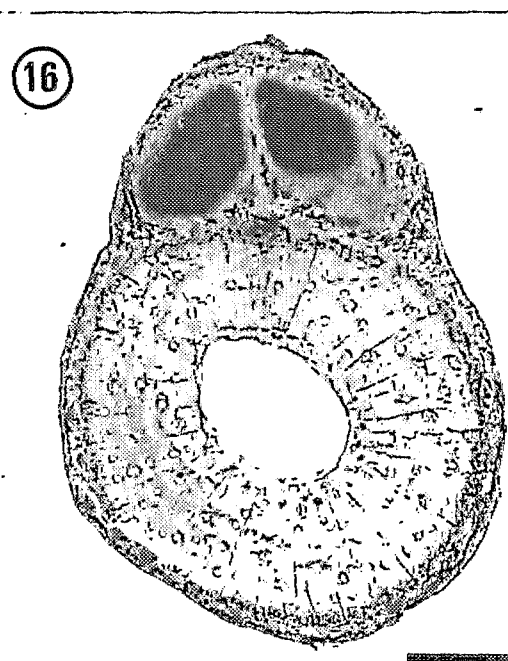
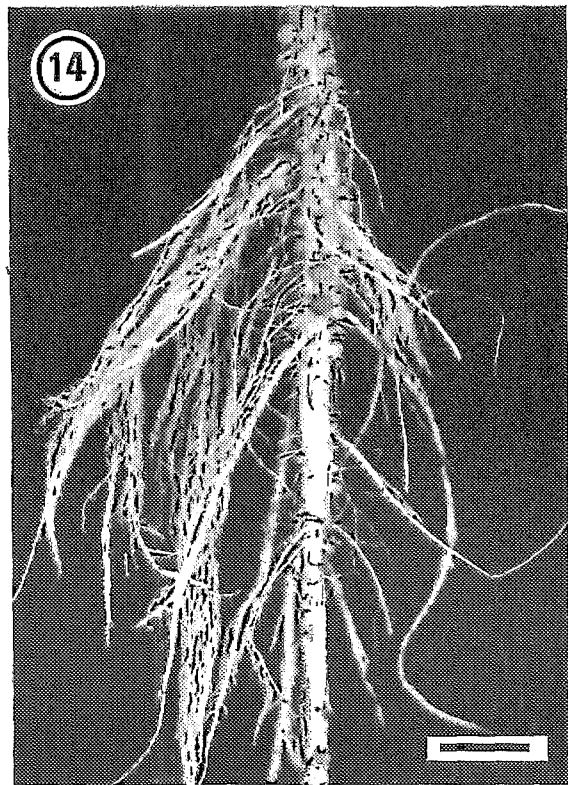
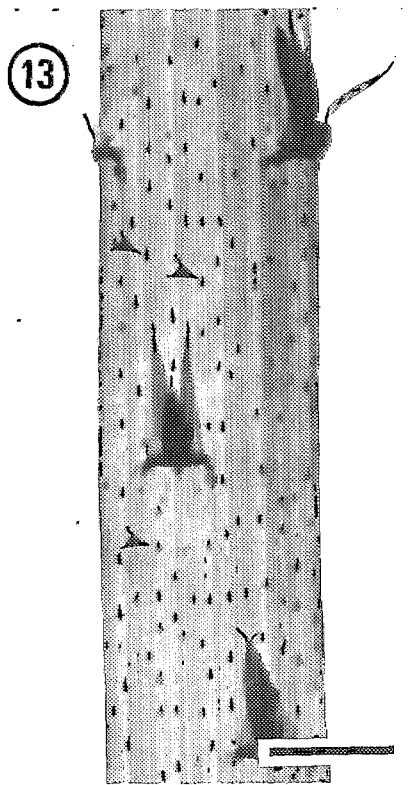
**Figure 13:** Développé de la tige d'*A. afraspera* montrant les sites de nodulation (pointes de flèches) répartis sur de très nombreuses génératrices verticales.  
La barre représente 1 cm.

**Figure 14:** Système racinaire d'une jeune plante d'*A. afraspera* (5 semaines) cultivée en conditions inondées. La plupart des nodules apparaissent sur la racine pivotante principale de la plante.  
Barre = 1 cm.

**Figure 15:** Jeune nodule sur la tige d'*A. afraspera* 5 jours après l'inoculation. A ce stade, l'apex du primordium racinaire, rejeté vers l'extérieur par le nodule en développement, est proéminent. Par la suite, il dégénère.  
Barre = 1 mm.

**Figure 16:** Coupe longitudinale d'un nodule d'*A. afraspera* âgé de 15 jours.  
Barre = 1 mm.

Fixation FAA; inclusion dans le Paraplast (+); coloration par le bleu de toluidine à 0,1%.



## PLANCHE IV

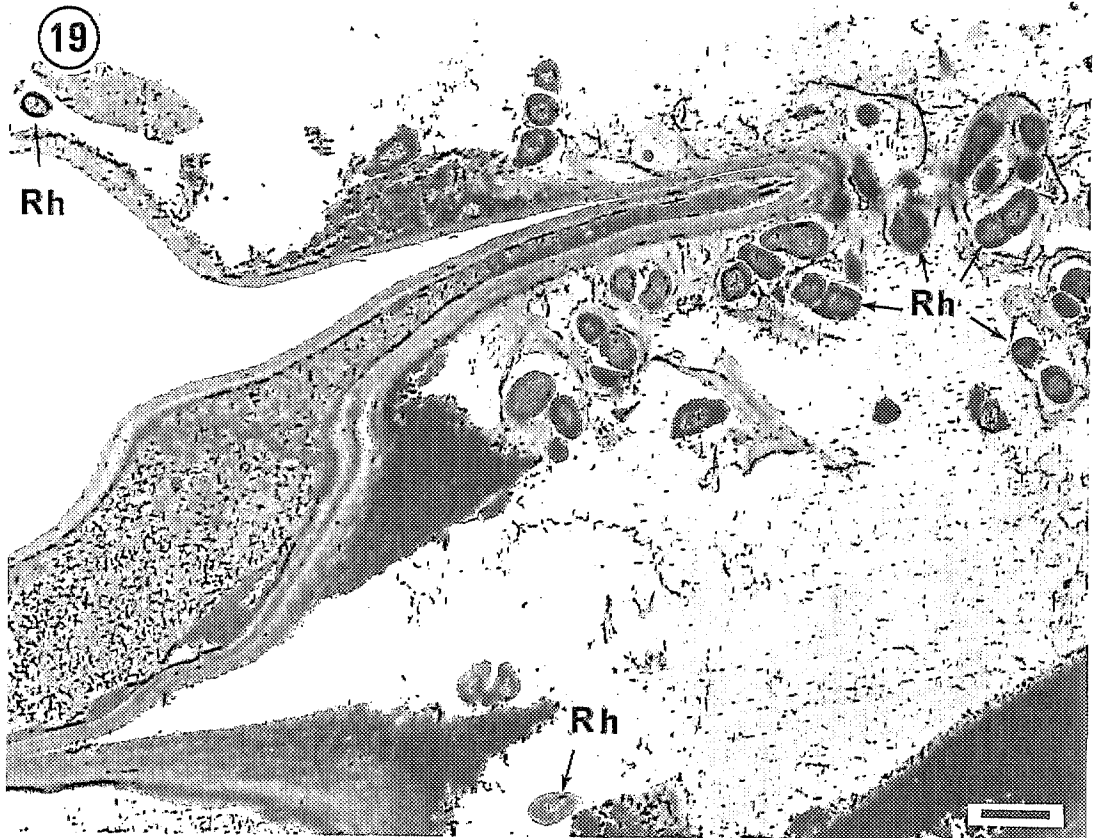
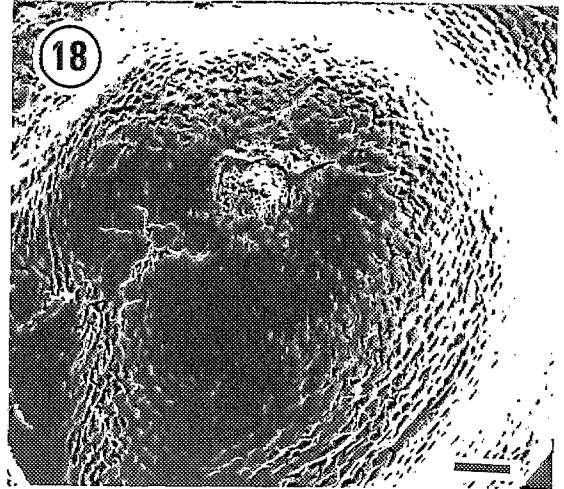
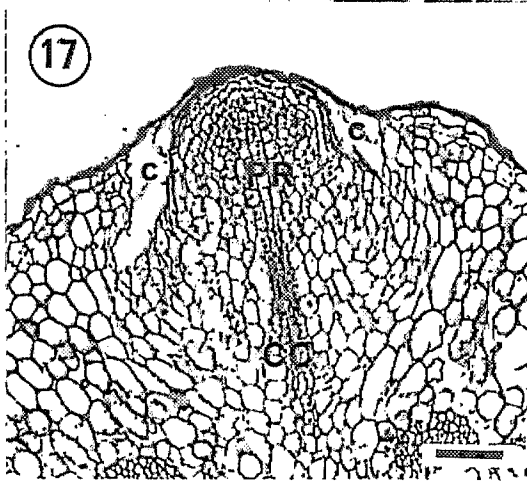
**Figure 17:** Coupe longitudinale de l'ébauche racinaire d'un site de nodulation d'*A. afraspera*.  
Barre = 1 cm.

Fixation FAA; inclusion dans le Paraplast (+); coloration par le bleu de toluidine à 0,1%.

**Figure 18:** Microscopie électronique à balayage. Site de nodulation développé, composé d'un dôme épidermique percé en son centre par l'ébauche racinaire.  
Barre = 0,1 mm.

**Figure 19:** Microscopie électronique à transmission (MET). Pénétration des rhizobia dans les espaces intercellulaires au fond de la cavité annulaire dégagée autour du primordium racinaire.  
Barre = 1  $\mu$ m.

C, cavité; CC, cylindre central; PR, primordium racinaire; Rh, rhizobium.



## PLANCHE V

**Figure 20:** Microscopie photonique. Coupe longitudinale à travers un site de nodulation, 2 jours après l'infection par la souche ORS322. On distingue une cellule infectée très élargie (flèche) et une zone méristématique en formation.

Barre = 100  $\mu$ m.

Coupe semi-fine; fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

**Figure 21:** Agrandissement de la cellule infectée désignée par la flèche sur la figure A. Cette cellule possède un noyau et un nucléole très volumineux, un cytoplasme dense et des contours irréguliers qui lui donnent une forme étoilée.

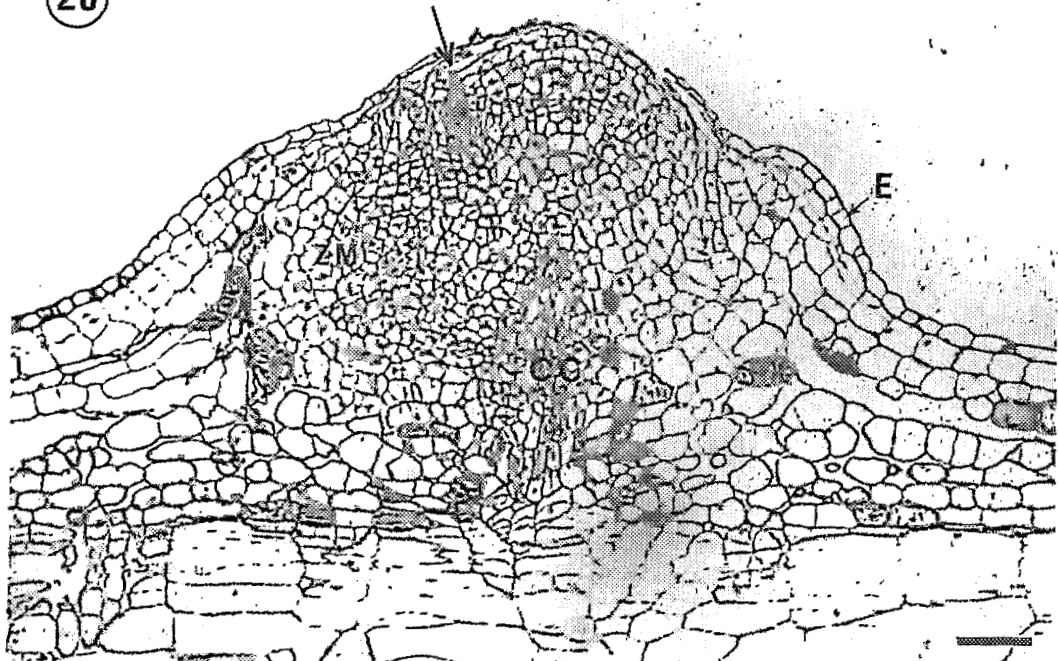
Barre = 50  $\mu$ m.

**Figure 22:** Coupe transversale d'un site de nodulation effectuée au niveau du fond de la cavité annulaire. La cellule infectée apparaît située dans le cortex externe du primordium racinaire. Un réseau de cellules applaties (pointes de flèches) délimite les tissus corticaux du primordium racinaire de ceux de la tige.

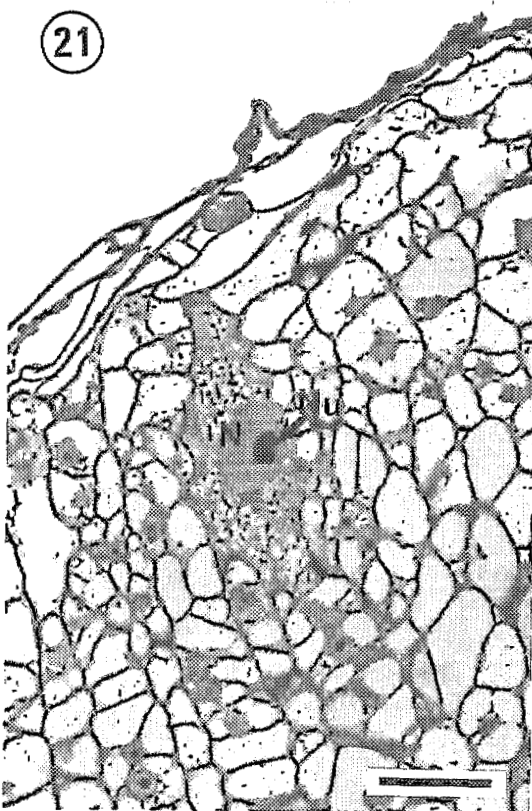
Barre = 50  $\mu$ m.

CC, cylindre central; CT, cortex de la tige; E, épiderme; N, noyau; Nu, nucléole; PR, primordium racinaire; ZM, zone méristématique.

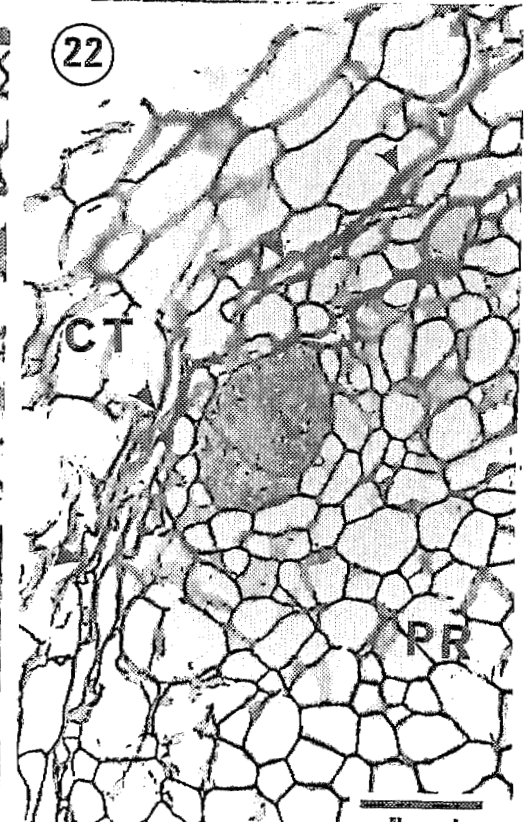
20



21



22



## PLANCHE VI

**Figures 23 et 24:** MET. Cellules de la zone méristématique (MZ, fig. 20) induite à distance au dessous de la cellule infectée initiale. Les cellules sont de petite taille et leur rapport nucléoplasmique est élevé.

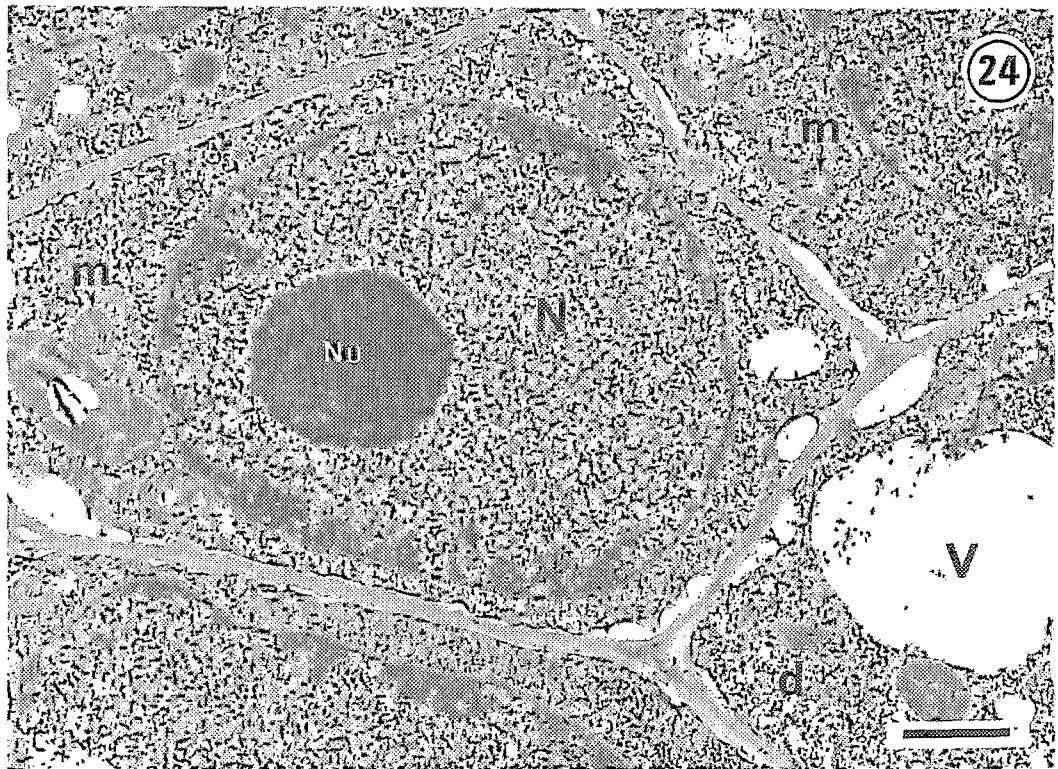
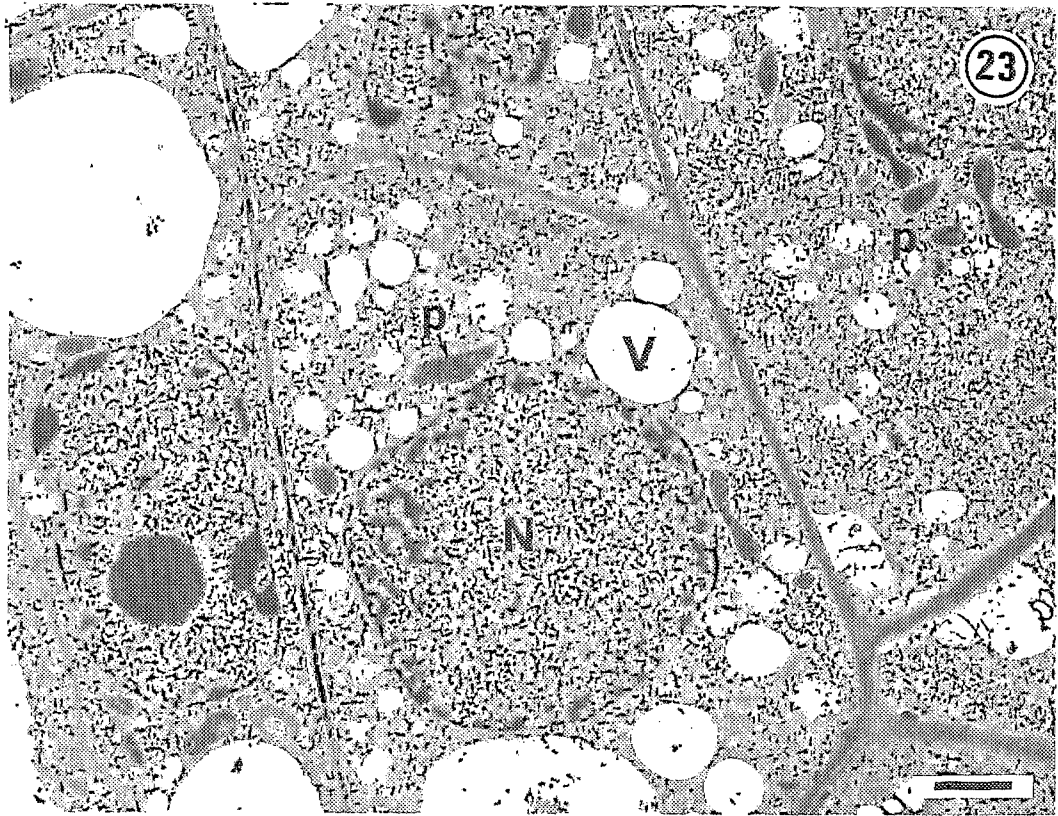
La barre représente:

Fig. 23: 2  $\mu\text{m}$ .

Fig. 24: 1  $\mu\text{m}$ .

d, dictyosomes; M, mitochondries, N, noyau; Nu, nucléole; p, plastes; V, vacuoles.





## PLANCHE VII

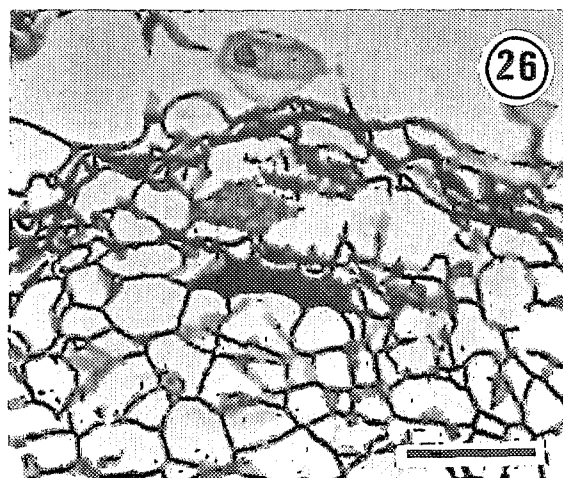
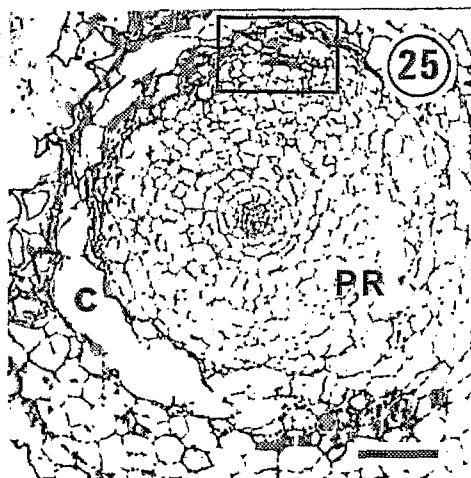
**Figure 25:** Vue générale d'une coupe transversale d'un site de nodulation infecté depuis 3 jours montrant la cellule infectée clairement localisée dans le cortex du primordium racinaire.  
Barre : 0,1 mm

Coupe semi-fine; fixation par la glutaraldéhyde, inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

**Figure 26:** Agrandissement de la portion encadrée sur la figure 25. La cellule infectée initiale a dégénéré et son contenu est fortement coloré.  
Barre : 50  $\mu$ m.

**Figure 27:** MET de la cellule de figure 26 montrant de très nombreux rhizobia inclus dans un matériel matriciel très dense aux électrons.  
Barre: 2  $\mu$ m.

C, cavité; PR, primordium racinaire; Rh, rhizobia.



## PLANCHE VIII

**Figures 28 et 29:** Coupes transversales d'un site de nodulation montrant plusieurs cellules infectées (flèches courbes). Sur la vue générale de la figure 29, on observe une ceinture de cellules contenant des tanins (doubles flèches) entourant la zone de cellules infectées.

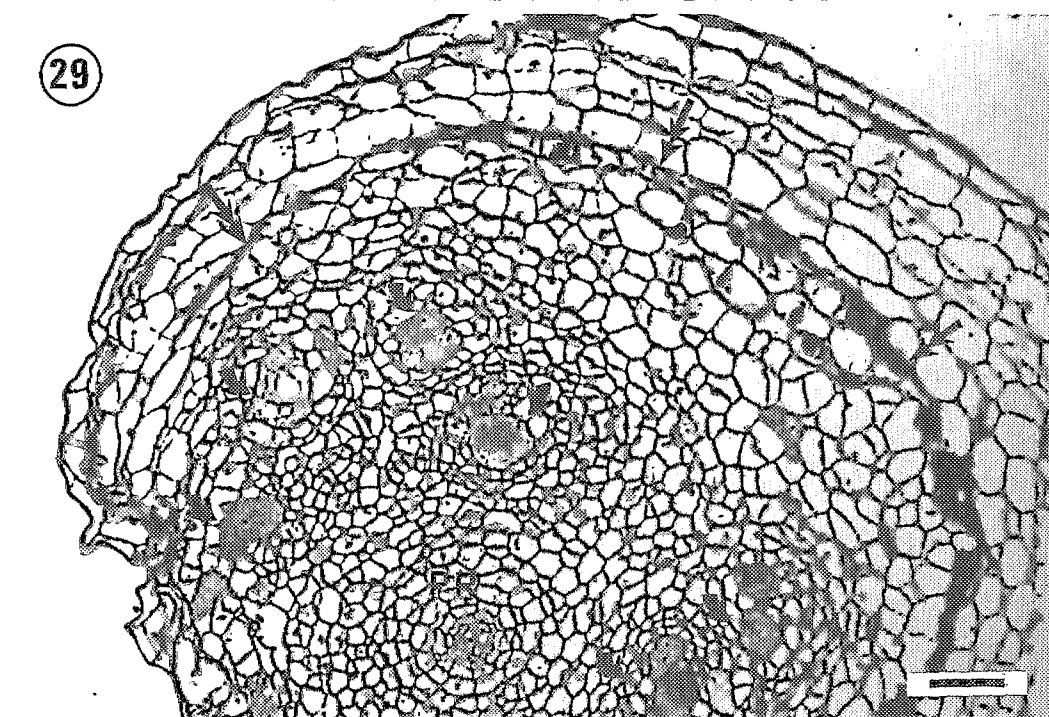
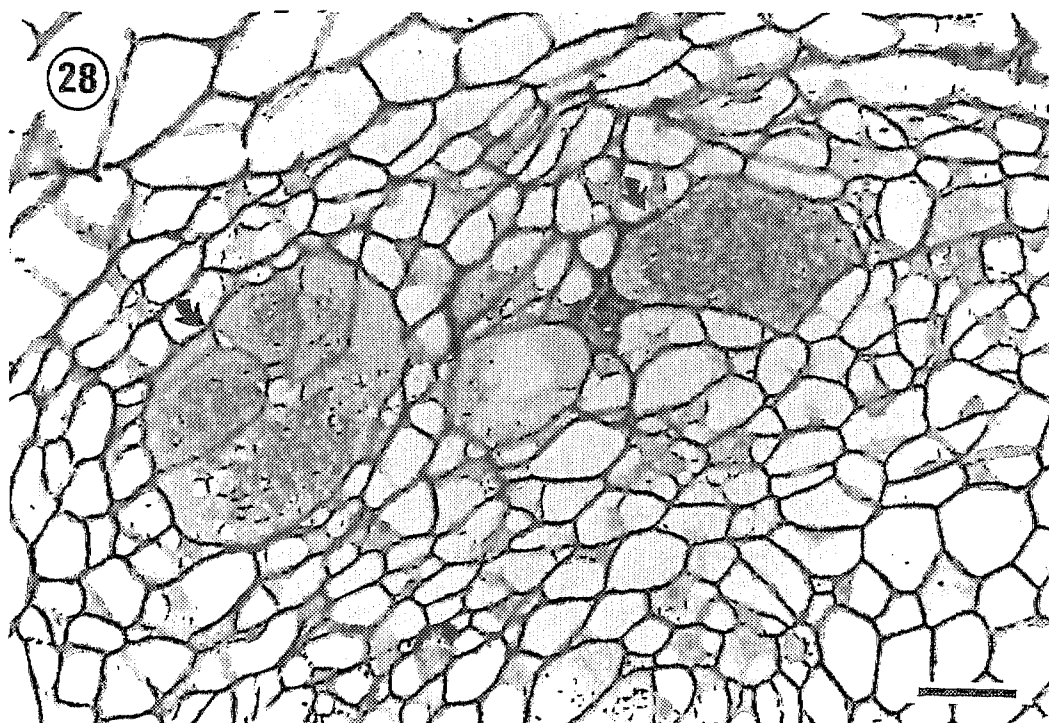
La barre représente:

Fig. 28: 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 29: 100  $\mu\text{m}$ .

Coupes semi-fines; fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

PR, primordium racinaire.



## PLANCHE IX

**Figure 30:** MET. Infection des cellules corticales par les rhizobia, selon un processus d'expansion de la paroi cellulaire de la cellule hôte. Au point d'entrée dans la cellule, les rhizobia sont inclus dans un matériel d'origine pariétale limité par la membrane plasmique. Le cytoplasme de la cellule envahie est désorganisé.

Barre: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figures 31 et 32:** MET. Rhizobia présents dans la paroi des cellules de l'hôte.

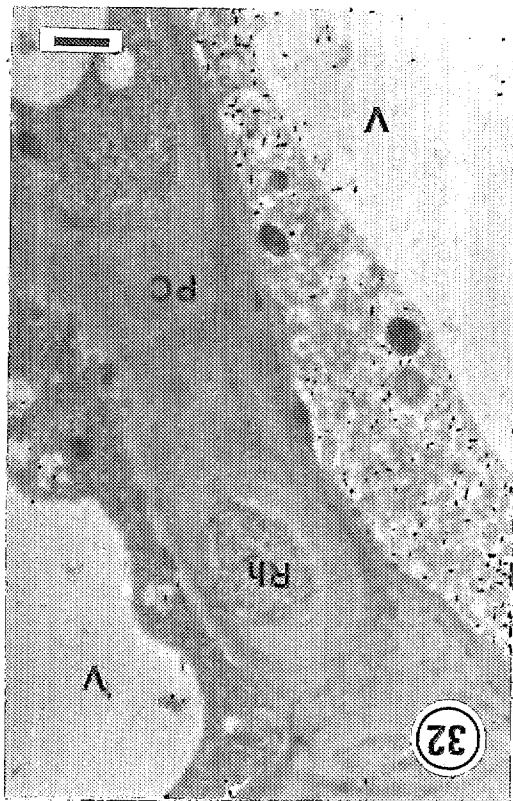
La barre représente:

Fig. 31: 0,5  $\mu\text{m}$ .

Fig. 32: 1  $\mu\text{m}$ .

d, dictyosomes ; lm, lamelle moyenne; mp, membrane plasmique; PC, paroi cellulaire; Rh, rhizobia; V, vacuoles.





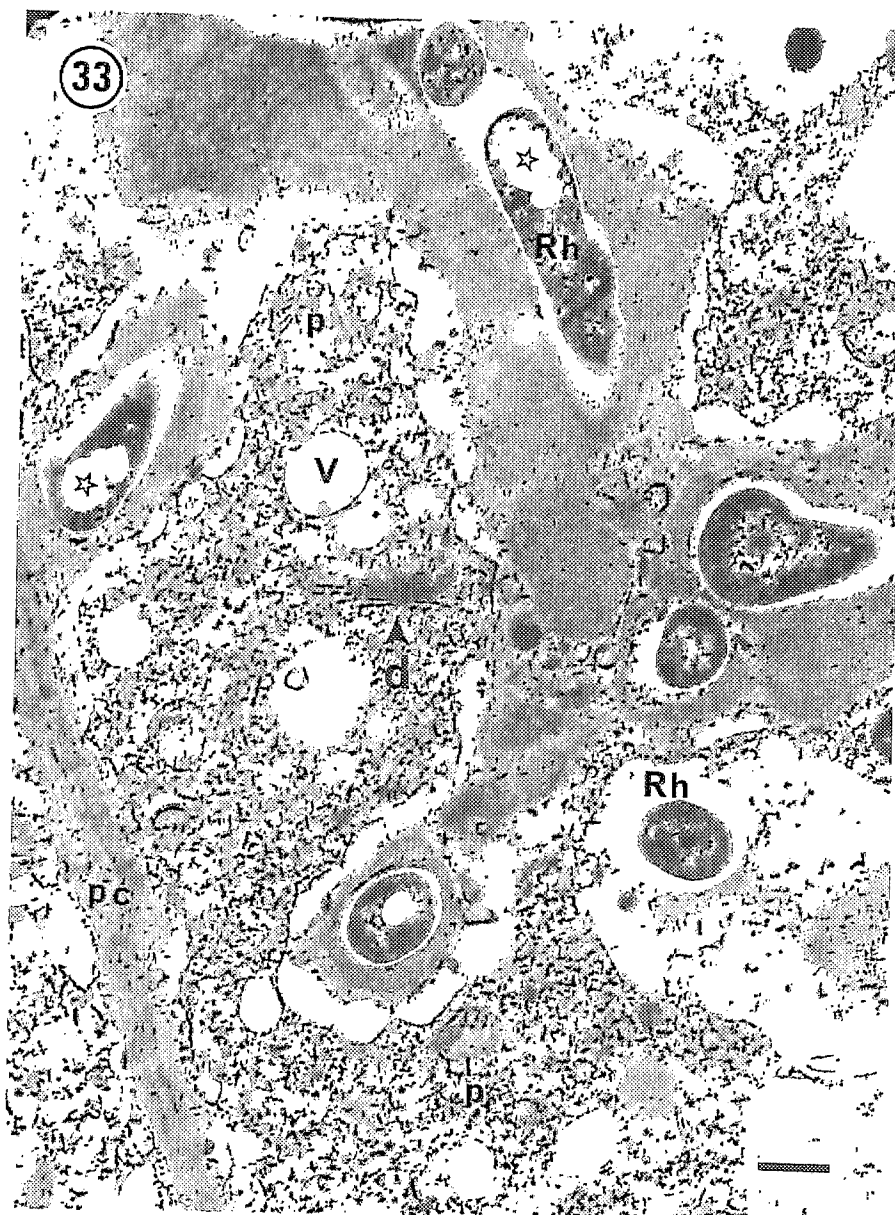
**PLANCHE X**

**Figure 33:** Etape plus tardive de l'invasion des cellules hôtes par les rhizobia. Le cytoplasme de la cellule envahie se désorganise progressivement.

Barre: 0,5  $\mu\text{m}$ .

d, dictyosomes; p, plastes; PC, paroi cellulaire; Rh, rhizobia; V, vacuoles; ☆ , granules de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB).





## PLANCHE XI

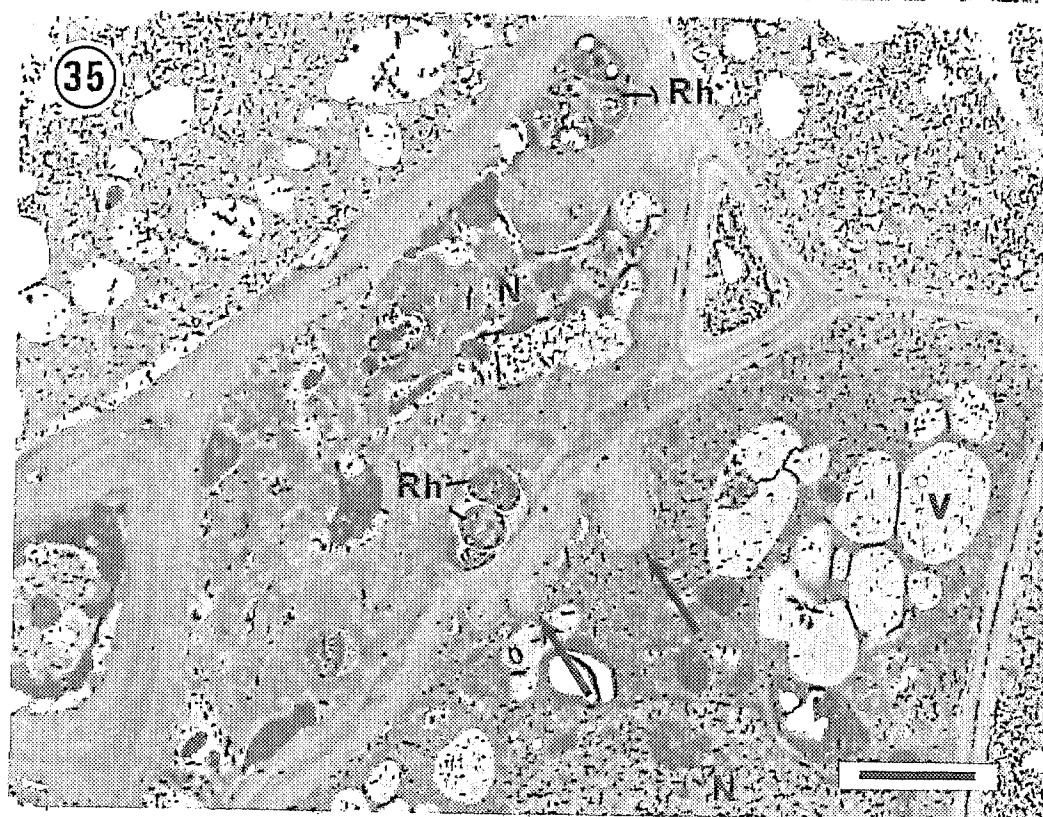
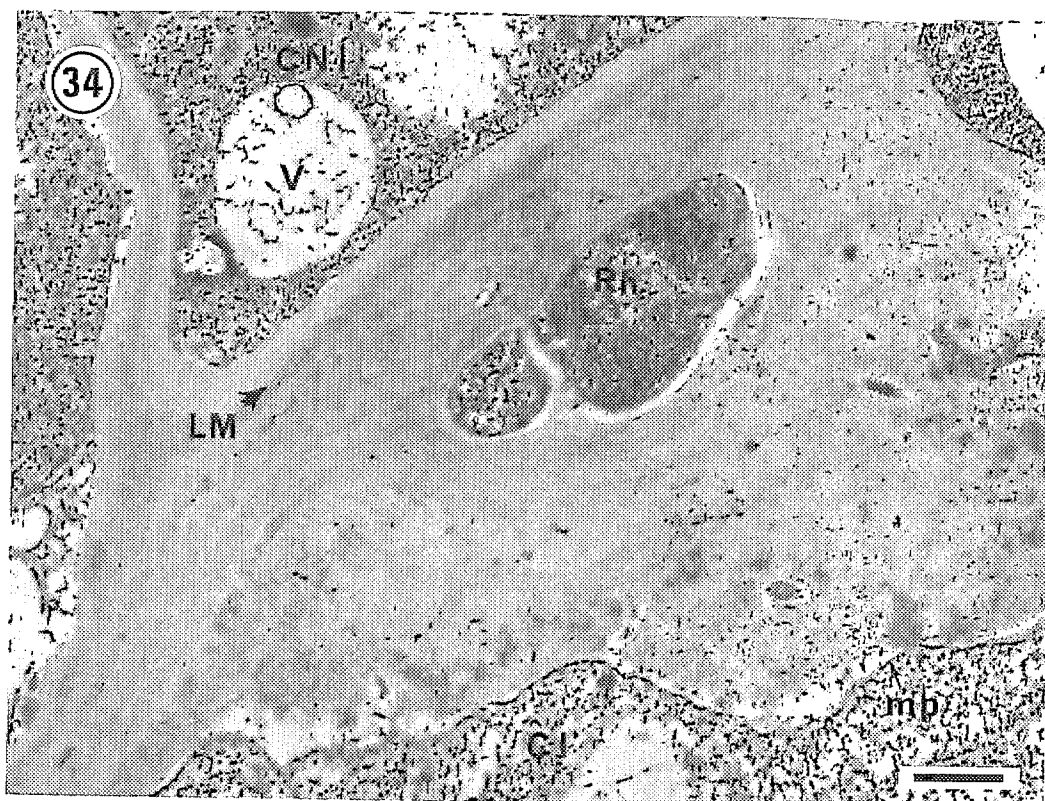
**Figure 34:** MET. Infection des cellules corticales. Noter la différence de structure entre le cytoplasme de la cellule infectée (CI) et celui de la cellule non infectée (CNI).

Barre: 0,5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 35:** MET. Progression de l'infection. La cellule centrale comprimée par les cellules voisines, a dégénéré. Elle est pratiquement remplie de matériel matriciel d'origine pariétale dans lequel sont inclus quelques rhizobia. Seul le noyau est encore reconnaissable. La cellule adjacente est en voie d'infection comme le montrent les invaginations de sa paroi (flèches).

Barre: 2  $\mu\text{m}$ .

LM, lamelle moyenne; mp, membrane plasmique; N, noyau; Rh, rhizobium; V, vacuoles.



## PLANCHE XII

**Figure 36:** Microscopie photonique. Vue générale d'une coupe longitudinale à travers un site de nodulation 3 jours après l'infection. Deux traces infectieuses (TI) constituées par des cellules infectées qui s'infiltrent en profondeur depuis la cavité annulaire jusqu'à la zone méristématique (ZM). Remarquer la couche de cellules contenant des tanins (petites flèches) qui se met en place autour de la zone méristématique.

**Figures 37 et 38:** Agrandissement des traces infectieuses.

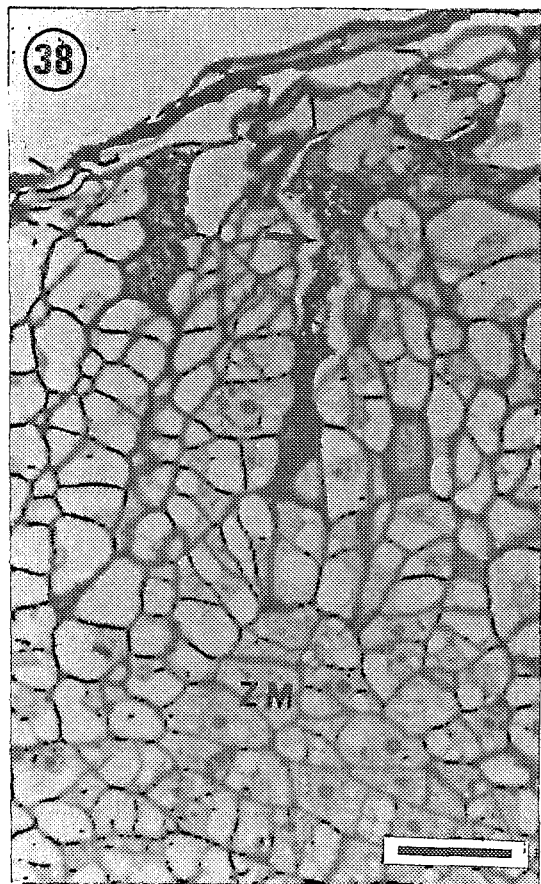
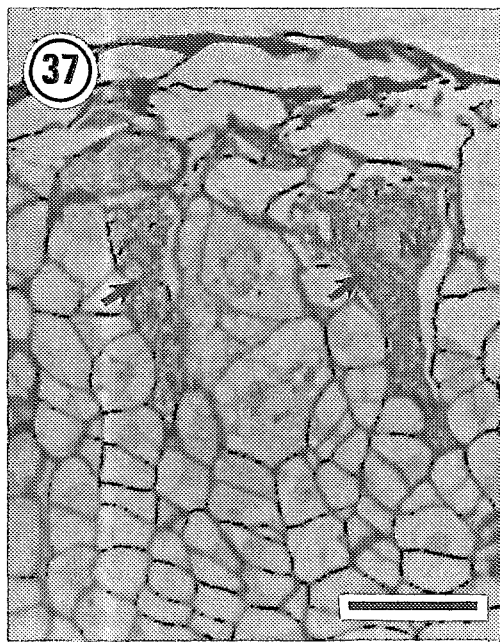
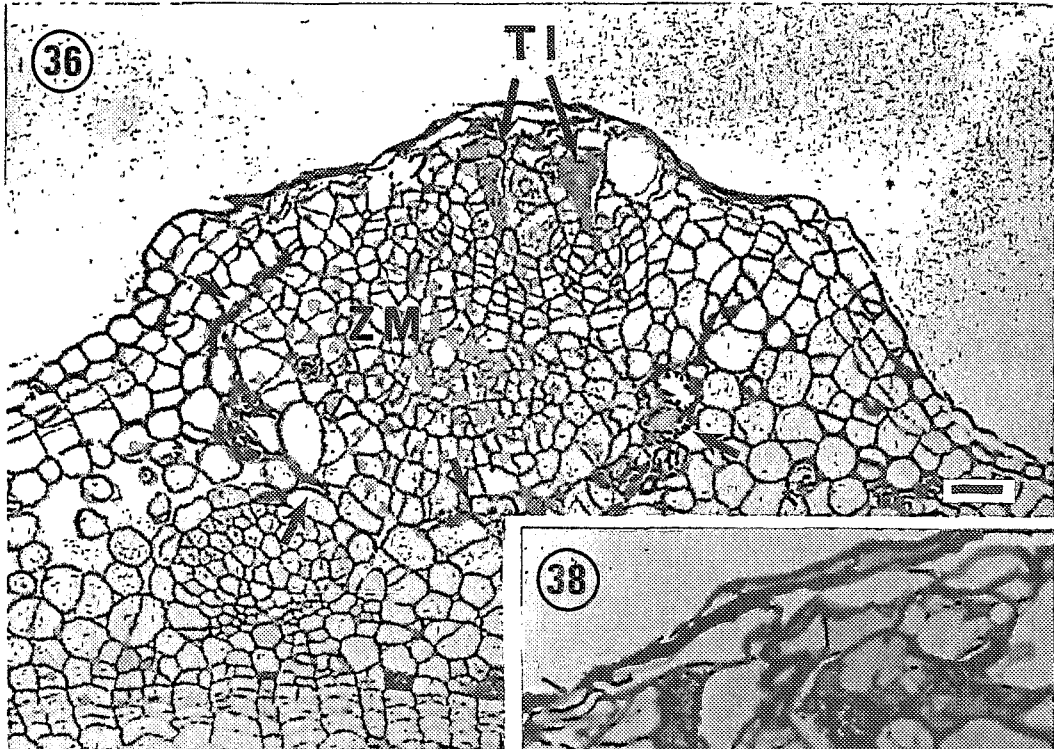
**Fig. 37 :** Agrandissement des traces infectieuses désignées par les larges flèches sur la figure A. Les traces infectieuses (flèches) paraissent constituées, à ce stade, par une seule cellule très élargie et en voie de dégénérescence, semblable à celle de la planche V, A.

**Fig. 38 :** Agrandissement d'une trace infectieuse (flèche) sur le point d'atteindre la zone méristématique (ZM).

Les barres représentent 50  $\mu$ m.

Coupes semi-fines; fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

N, noyau



## PLANCHE XIII

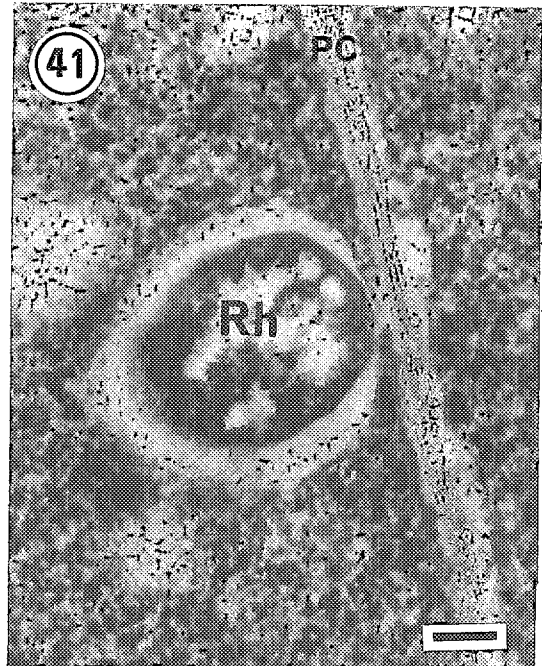
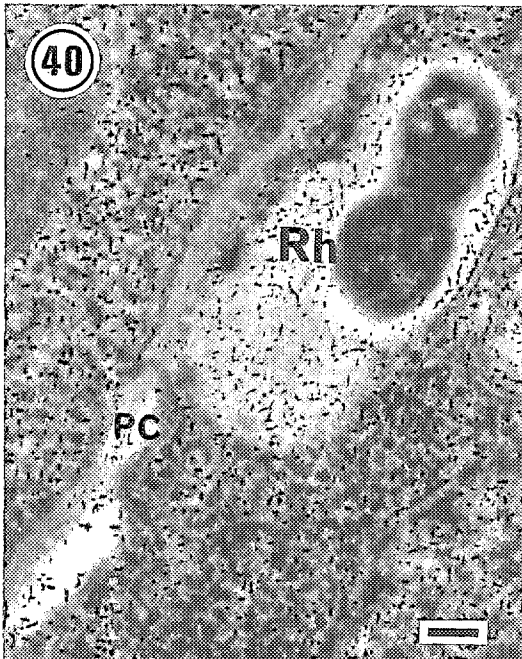
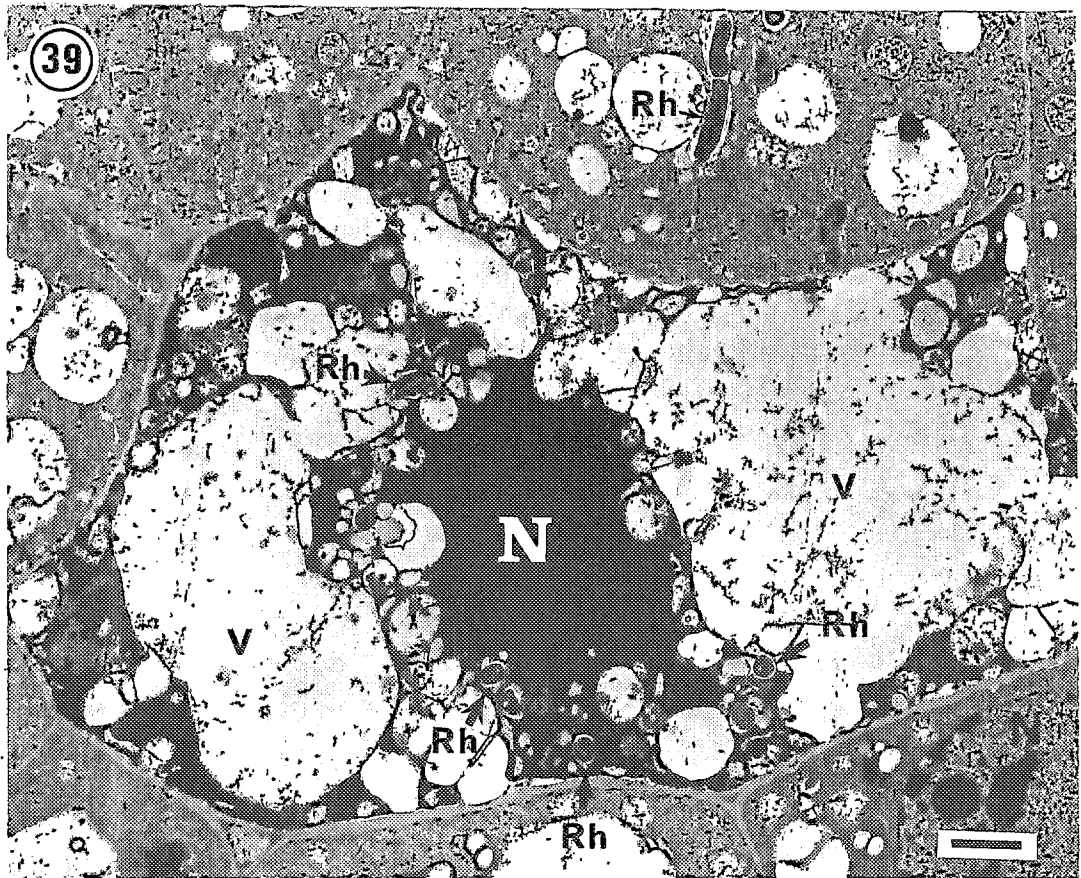
**Figure 39:** MET. Coupe fine dans la zone méristématique infectée montrant une cellule en cours de dégénérescence. Cette cellule possède un cytoplasme très fortement coloré contenant de grandes vacuoles et de nombreux rhizobia inclus dans des membranes de séquestration. Cette cellule est entourée de cellules méristématiques intactes dans lesquelles on observe quelques rhizobia. Noter la division des rhizobia dans les cellules méristématiques.

**Figures 40 et 41:** Rhizobia dans les cellules méristématiques dont la membrane de séquestration est reliée aux parois cellulaires (PC).

Les barres représentent 0,2  $\mu\text{m}$ .

N, noyau; Rh, rhizobia; V, vacuoles.





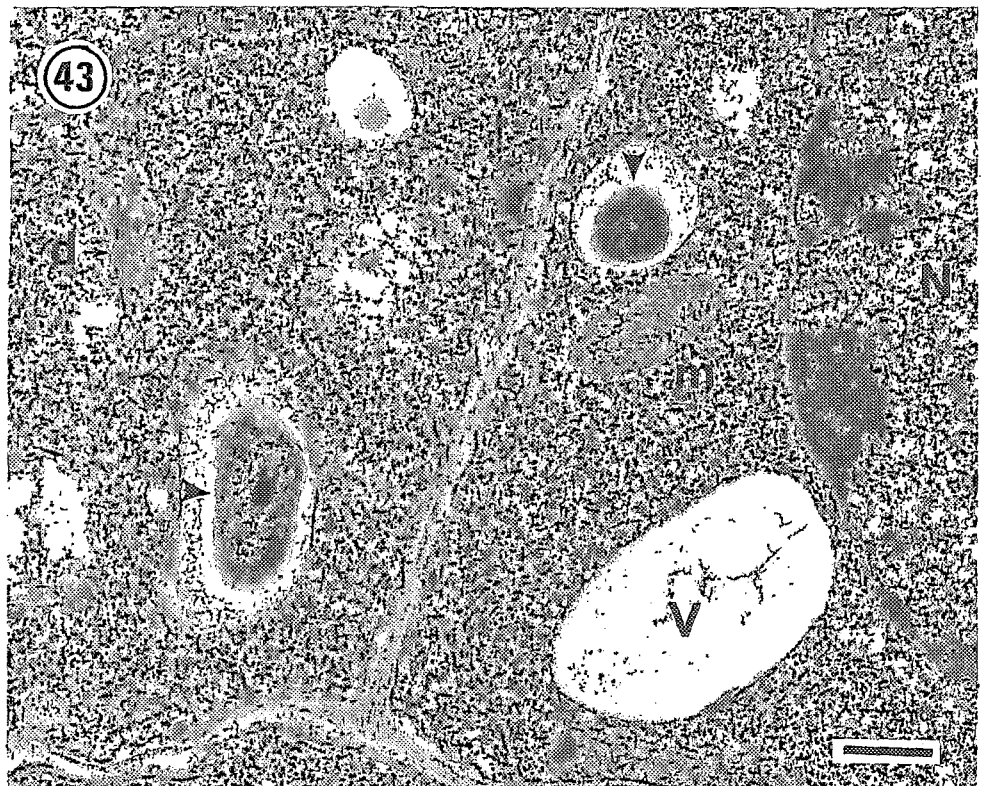
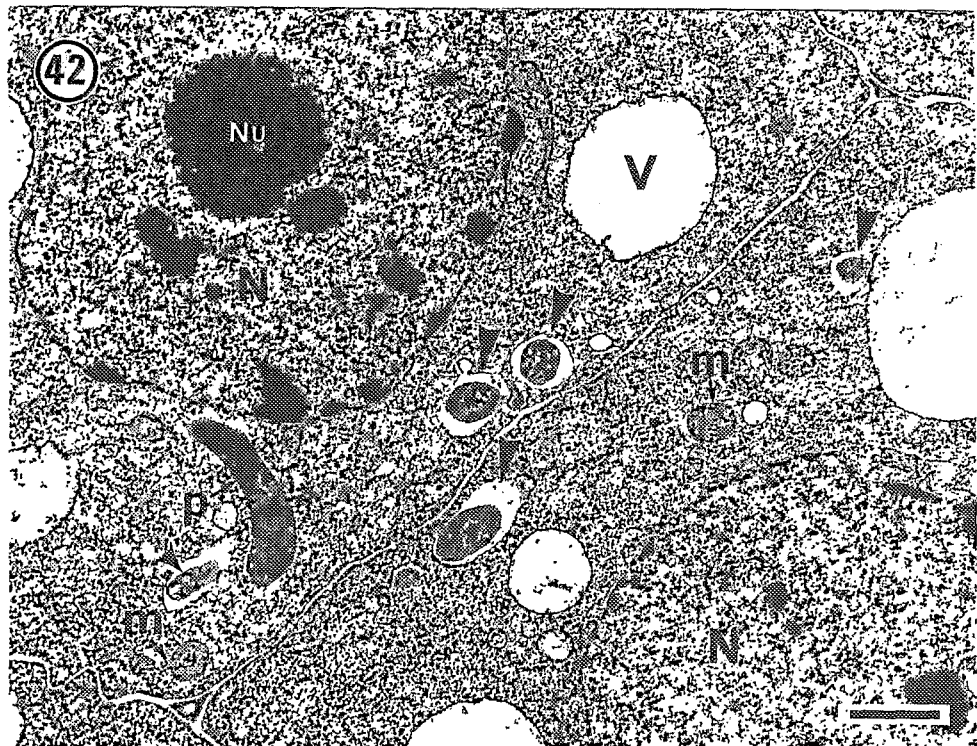
## PLANCHE XIV

**Figures 42 et 43:** MET. Zone méristématique infectée. Les coupes réalisées dans la zone méristématique 4 jours après l'inoculation révèlent la présence de quelques rhizobia inclus dans une membrane péribactéroïdienne.

Les barres représentent 0,5  $\mu\text{m}$ .

d, dictyosomes; m, mitochondries; N, noyau; Nu, nucléole; p, plastes; V, vacuoles.





## PLANCHE XV

**Figure 44:** Microscopie photonique d'une portion d'un nodule âgé de 12 jours montrant la différenciation du tissu central du nodule (TC). Des cordons vasculaires du nodule (CV) sont présents dans les cellules bordantes non infectées du tissu central du nodule.

Barre: 0,1  $\mu\text{m}$ .

**Figures 45 et 46:** Agrandissements dans la partie périphérique du tissu central du nodule de la figure A.

Figure 45: Cellules hôtes en cours de mitose.

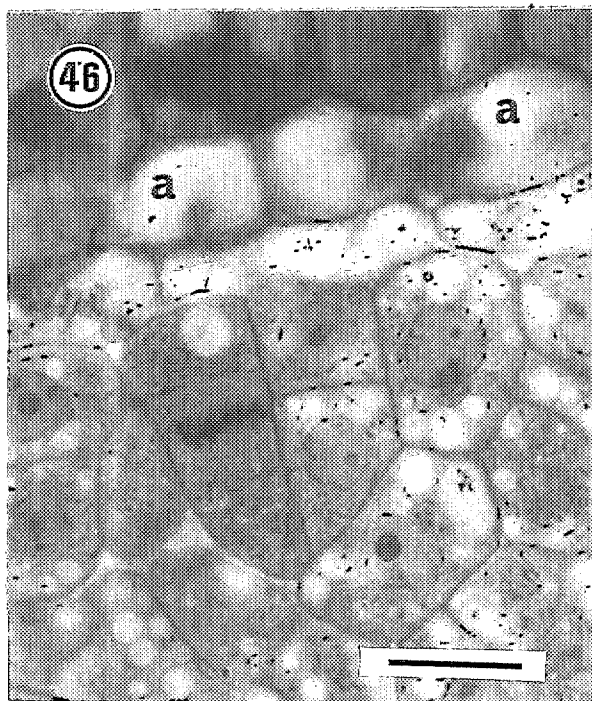
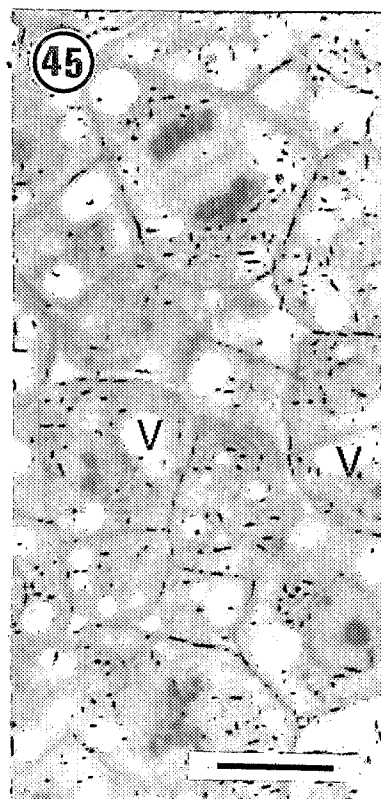
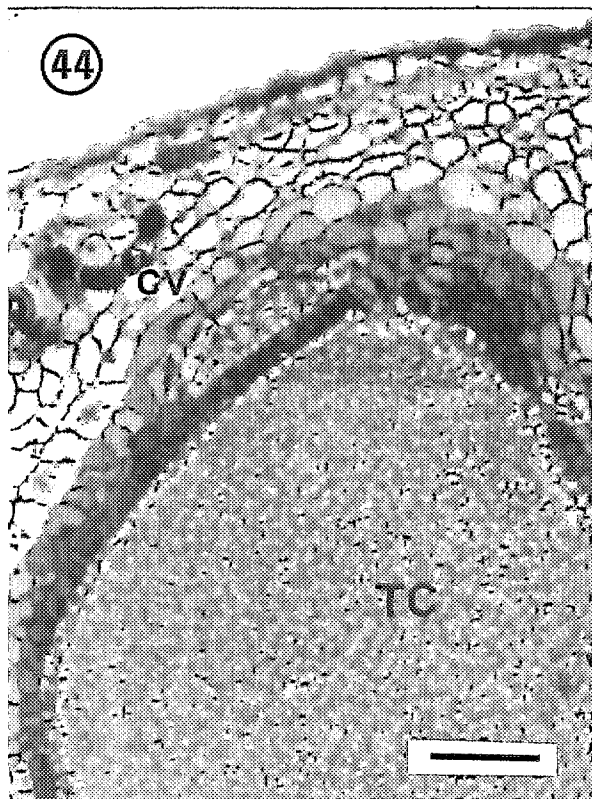
Figure 46: Les cellules bordantes non infectées contiennent de volumineux grains d'amidon. L'orientation des mitoses indique que la croissance du nodule est radiale.

Les barres représentent 10  $\mu\text{m}$ .

Coupes semi-fines; fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'héματοxyline.

**Figure 47:** MET. Rhizobium dans le tissu central du nodule. Les rhizobia ont une forme de bâtonnets et sont inclus dans une membrane pér bactéroïdienne. Leur matériel nucléaire condensé est associé à des granules de polyphosphates (pointes de flèches). Des inclusions de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (☆) sont fréquemment observés aux extrémités polaires des bactéries.

Barre: 0,5  $\mu\text{m}$ .



## PLANCHE XVI

**Figures 48 et 49:** MET. Aspect fibrillaire de l'ADN des rhizobia à l'état de bactéroïdes obtenu par la méthode de fixation de Ryter et Kellenberger (1958).

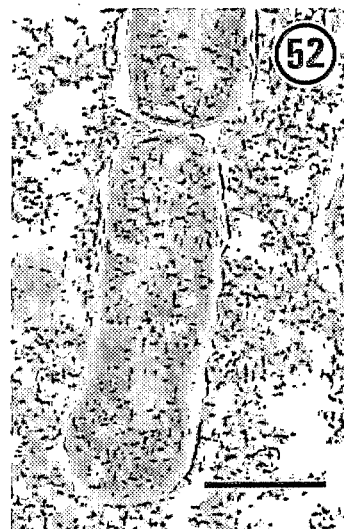
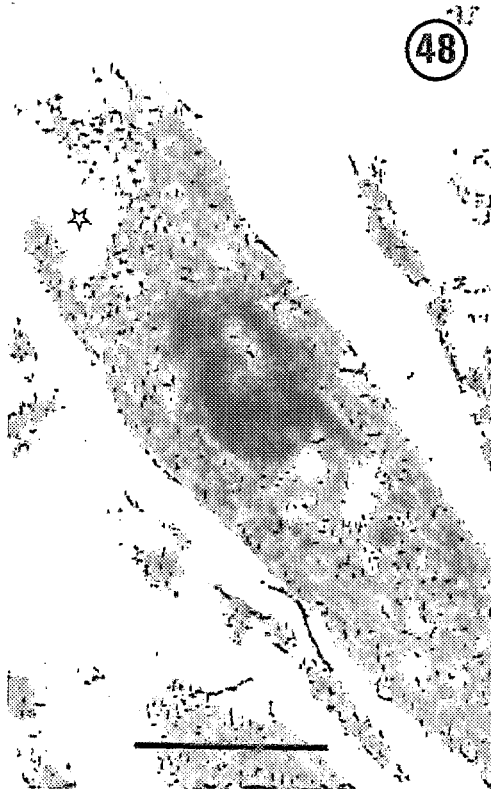
**Figure 50:** Aspect compact, dense aux électrons du nucléoïde bactérien obtenu par la fixation glutaraldéhyde-acide osmique suivie par la coloration à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb (témoin).

**Figure 51:** Action combinée de la pronase (12 h) et de la DNase (4 h) sur les coupes fines. Le matériel nucléaire est digéré laissant apparaître quelques granules de polyphosphates (p).

**Figure 52:** Coloration régressive à l'EDTA. L'action de l'EDTA pendant 30 min. fait perdre toute "coloration" au nucléoïde bactérien. Seuls les ribosomes apparaissent contrastés.

Les barres représentent 0,5  $\mu\text{m}$ .

☆ , gouttelettes de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB).



## PLANCHE XVII

**Figure 53:** Microscopie photonique. Coupe longitudinale d'un nodule âgé de 12 jours montrant deux zones de tissu central infecté (TCI) ainsi que plusieurs autres zones d'infection secondaire (IS, flèches). Remarquer la couche de rhizobia qui recouvre la zone d'infection secondaire indiquée par la double flèche.

Barre: 0,1 mm.

Coupe semi-fine; fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

**Figure 54:** Coupe longitudinale d'un nodule âgé de 15 jours montrant deux zones infectées situées de part et d'autre de la vascularisation de l'ébauche racinaire.

Barre: 0,5 mm.

**Figure 55:** Coupe transversale d'un nodule âgé de 15 jours. Les deux zones de tissu central infecté sur la partie supérieure du cliché sont en train de fusionner. Elles ne sont plus séparées que par une seule rangée de cellules non infectées. De très nombreux cordons vasculaires (flèches) entourent les zones de tissu central.

Barre: 0,5 mm.

**Figure 56:** Coupe longitudinale d'un nodule âgé de 10 jours montrant une zone de tissu infecté en cours de différenciation et une zone d'infection secondaire (flèche).

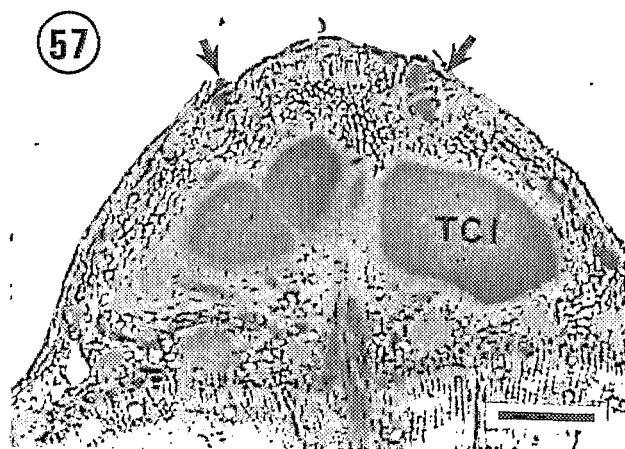
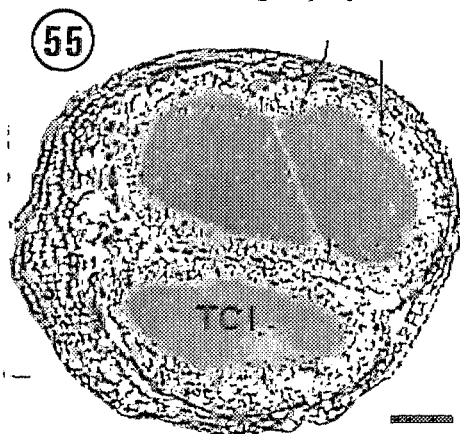
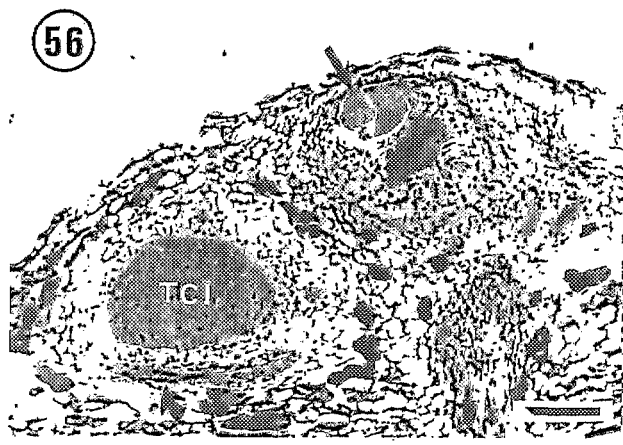
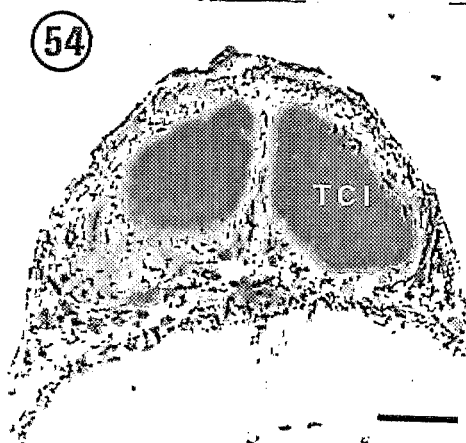
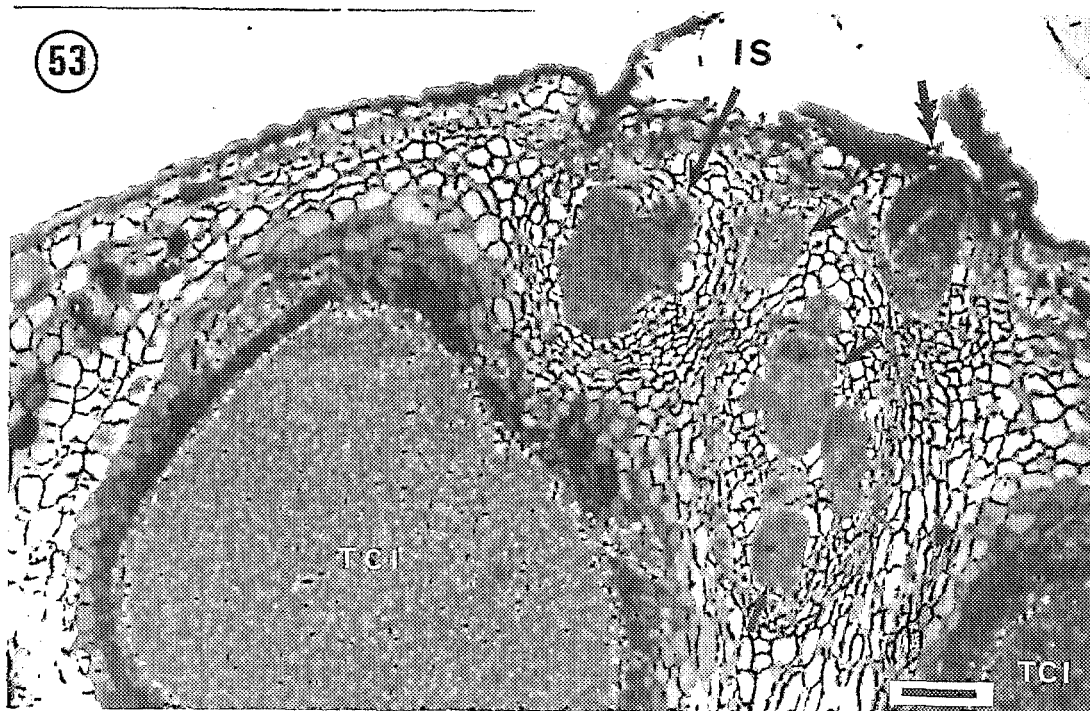
Barre: 0,2 mm.

**Figure 57:.** Coupe longitudinale d'un nodule âgé de 12 jours montrant 3 zones de tissu infecté dont 2 sont en cours de fusion et 2 zones d'infection secondaire (flèches).

Barre: 0,5 mm.

Fixateur FAA; inclusion dans le Paraplast (+); coloration par le bleu de toluidine.





## PLANCHE XVIII

## Zones d'infection secondaire.

**Figure 58:** Microscopie photonique. Agrandissement de la zone d'infection secondaire en position centrale sur la figure 53. Les grandes cellules infectées (Ci) sont entourées par un réseau de cellules épidermiques de petite taille.  
Barre: 0,1 mm.

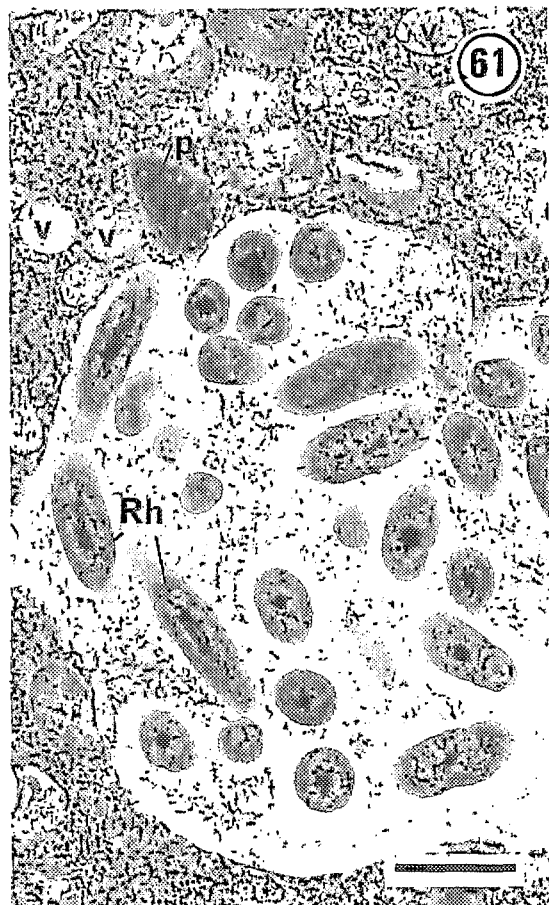
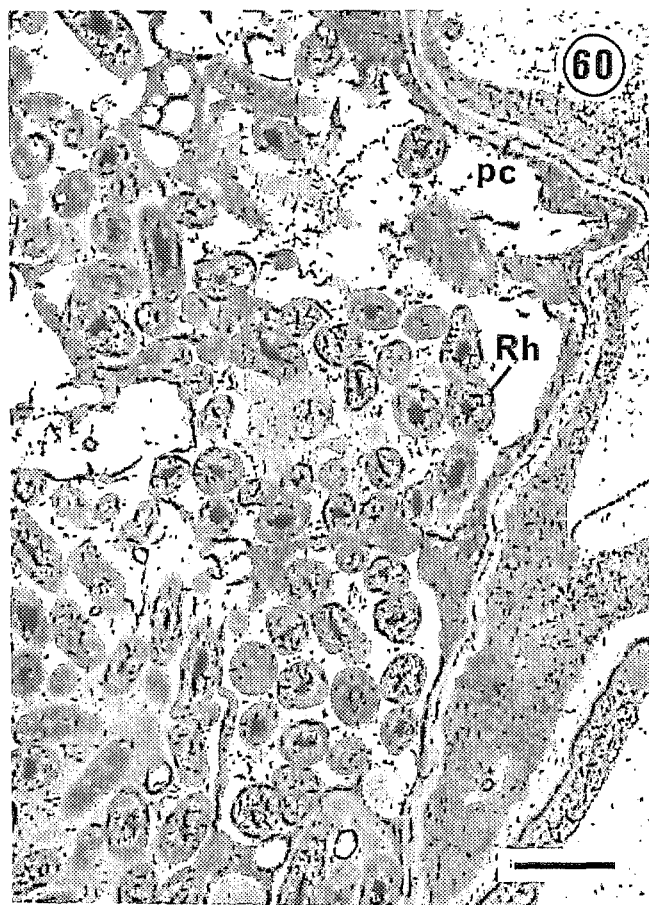
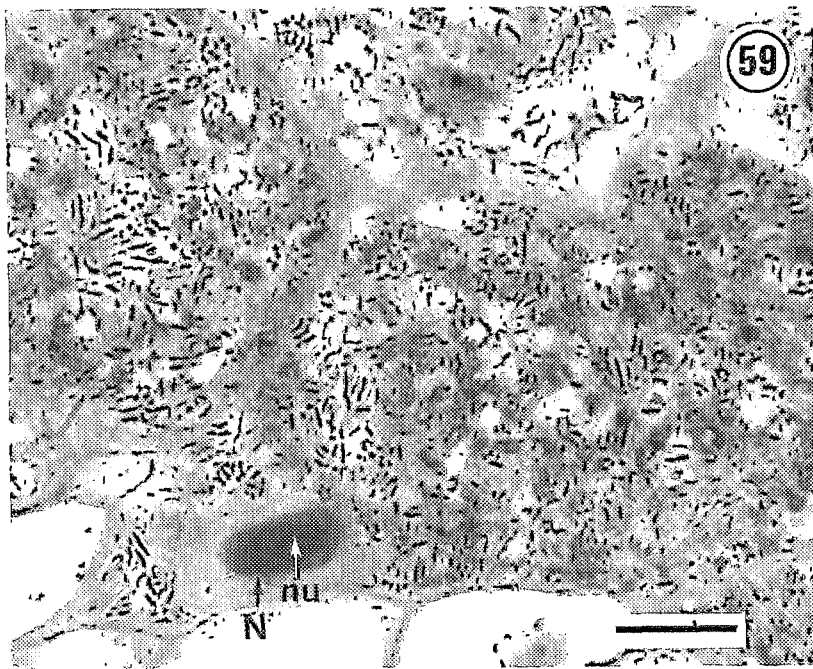
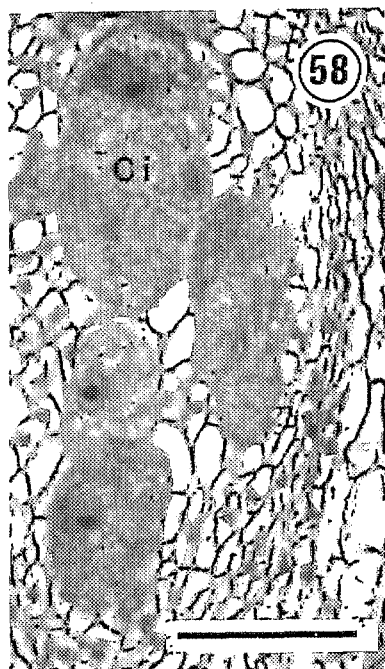
**Figure 59:** Cellule infectée de la zone d'infection secondaire remplie de rhizobia.  
Barre: 10  $\mu\text{m}$ .

Fixation par la glutaraldéhyde; inclusion dans l'Epon; coloration par l'hématoxyline.

**Figures 60 et 61:** MET. Les cellules de la zone d'infection secondaire renferment des rhizobia inclus en grand nombre dans des membranes pér bactéroidiennes.  
Les barres représentent 1  $\mu\text{m}$ .

N, noyau; Nu, nucléole; p, plaste; pc, paroi cellulaire; Rh, rhizobium; ri, ribosomes; v, vacuoles.





Nom : ALAZARD

Prénom : Didier

**Titre:** LA NODULATION CAULINAIRE DANS LE GENRE *AESCHYNOMENE*.

Mots clés : *Aeschynomene*; *Bradyrhizobium*; fixation d'azote; nodulation caulinaire.

**RESUME :** Plusieurs espèces de légumineuses appartenant au genre *Aeschynomene* présentent, comme *Sesbania rostrata*, la particularité de porter des nodules fixateurs d'azote à la fois sur leurs racines et sur leur tige.

Une étude de la spécificité de nodulation des souches d'Aeschynomènes originaires de l'Afrique de l'Ouest a permis de distinguer trois groupes d'inoculation croisée dans le genre *Aeschynomene*.

Les espèces d'*Aeschynomene* à nodules caulinaires sont caractérisées par la présence sur leur tige de sites de nodulation prédéterminés, constitués par des ébauches racinaires adventives.

Chez *A. afraspera*, l'infection par le rhizobium spécifique a lieu directement dans les cellules corticales situées au fond de la cavité annulaire dégagée autour du primordium racinaire. L'infection se propage en profondeur, par dégénérescence successive des cellules infectées, jusqu'à une zone méristématique préalablement induite à distance. Le nodule se développe ensuite par division des cellules méristématiques infectées. Le processus d'infection ne fait intervenir ni poils absorbants, ni de cordons d'infection.

La plupart des rhizobia isolés des nodules caulinaires sont capables de fixer l'azote atmosphérique *in vitro* en cultures gélosées ou en cultures liquides sous de faibles tensions d'oxygène (0,5 %).

L'étude taxonomique de ces rhizobia les classe dans le genre *Bradyrhizobium*.

Sur le plan des applications agronomiques, les potentialités de fixation d'azote considérables (50 g N fixé/m<sup>2</sup>/60 jours) d'*A. afraspera* ou d'*A. nilotica* permettent leur utilisation comme engrais vert en riziculture irriguée. Les rendements en riz ont pu être doublés dans des essais en microparcelles. De plus, la fixation d'azote par les nodules caulinaires n'est pas inhibée par l'azote combiné présent dans le sol.